

ELISABETH CRISTINA GOMES DE MATTOS

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DA PASTA ENDODÔNTICA COMPOSTA POR  
TETRACICLINA, TIANFENICOL E ÓXIDO DE ZINCO**

Dissertação de Mestrado

Florianópolis  
2008

ELISABETH CRISTINA GOMES DE MATTOS

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA DA PASTA ENDODÔNTICA COMPOSTA POR  
TETRACICLINA, TIANFENICOL E ÓXIDO DE ZINCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -  
Graduação em Odontologia do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade Federal de  
Santa Catarina como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Odontologia -  
Área de Concentração Materiais Dentários.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho  
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo de Carvalho  
Chain

Florianópolis  
2008



ELISABETH CRISTINA GOMES DE MATTOS

**ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE E ANTIBIOGRAMA DA  
PASTA ENDODÔNTICA COMPOSTA POR TETRACICLINA,  
TIANFENICOL E ÓXIDO DE ZINCO**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de “Mestre em Odontologia”, área de concentração Materiais Dentários, e aprovada em sua forma final pelo Curso de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Dr. Ricardo de Souza Vieira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
da Universidade Federal de Santa Catarina

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho  
Orientador – UFSC

---

Prof. Dr. Ricardo Tramonte  
Membro

---

Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos  
Membro

---

Prof. Dr. Luiz Henrique Maykot Prates  
Suplente

*Dedico esta dissertação,*

*À minha filha Clarissa, que ilumina e inspira a  
minha vida e à minha mãe que está sempre ao  
meu lado.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Ao meu orientador, professor Dr. Rubens Rodrigues Filho, pela sua, preocupação com este trabalho, seu profissionalismo, e a disciplina e rigor que utilizou para me fazer mestre.*

*Ao meu co-orientador, professor Dr. Marcelo de Carvalho Chain, por todas as oportunidades, incentivos, ensinamentos, dedicação à profissão e competência.*

*Ao professor Dr. Luiz Henrique Maykot Prates, pelos constantes ensinamentos profissionais e didáticos, paciência, estímulo e carinho que me dedicou durante todo o curso.*

*Ao prof. Ricardo Tramonte, ao tempo dedicado a minha formação e a execução deste trabalho.*

*Ao grande amigo Dr. Carlos Renato Soares pela valorosa ajuda e estímulo nos estudos.*

*Ao amigo Dr. Sérgio Monteiro, pelo auxílio, vivacidade e exemplo de integridade.*

*Aos amigos e colegas de curso, Dra. Luciane Lucio e Silva Guedes, Dr. Henrique Damian Rosário, e Dra. Renata Fontanela Sander, pela alegria, amizade e companheirismo.*

*Ao prof. Dr. Carlos Alberto Justo da Silvar, diretor do Hospital Universitário pela ajuda inestimável na aquisição de materiais para esta pesquisa, viabilizando a execução da mesma.*

*A Fiocruz pela doação das cepas bacterianas usadas nesta pesquisa.*

*A FAPESP pela contribuição na aquisição de materiais para esta pesquisa.*

*Aos profs. Mario Peres, Adair Roberto Soares dos Santos, Elza de Fátima Albino Smânia, da área de Farmácia pela contribuição na execução deste trabalho.*

*Aos funcionários do departamento de estomatologia que contribuíram na execução deste trabalho.*

*A todos que, direta ou indiretamente, me auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa, tornando-a possível de ser realizada.*

*“Se tens fé, cumpre saberdes que tudo é  
possível àquele que a tem”.*

*Jesus*

## RESUMO

A finalidade deste estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos e a biocompatibilidade da pasta endodôntica tripla preparada com tetraciclina (8mg), tianfenicol (26.67mg) e óxido de zinco (1.25mg) utilizada na Universidade Estadual de Londrina, Faculdade de Odontologia. Sete tipos de microorganismos (*Bacilo cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *C.albicans*) obtidas da Coleção Americana de Cultura foram inoculadas no Agar e no caldo de carne de Mueller Hinton (laboratórios de Difco) e incubados a 35° C durante 24hs. Os cotonetes de algodão carregados com o caldo das bactérias ou fungos em suspensão ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) foram inoculados nas placas de Agar de Muller Hinton que continham 5 furos (com diâmetro de 7.0 milímetros cortados dentro do gel do Agar). Cada um foi preenchido posteriormente, com as quantidades da pasta endodôntica e de seus componentes individuais dissolvidos em 50µl do dimetil sulfoxido (DMSO). O hidróxido de cálcio (8 mg dissolvido em 50µl de DMSO) foi testado também. Além disso, dois compostos foram testados concentrados, o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado. O controle positivo foi considerado a tetraciclina o negativo o DMSO. As placas inoculadas com bactérias aeróbicas foram incubadas em 35°C por 20 h na atmosfera normal. Aqueles inoculados às bactérias anaeróbicas foram incubados usando um sistema Anaeróbico de Gás Pak (Becton, Dickinson) em 35°C para 72hs. Todos os materiais induziram zonas da inibição do crescimento. Óxido de Zinco e hidróxido de cálcio demonstraram a atividade antimicrobiana pequena. As zonas da inibição induzidas para o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado eram similares àquela mostrada pela pasta endodôntica. Além da atividade antimicrobiana, pastas endodônticas com antibióticos devem ser biocompatíveis. A pasta e seus componentes foram implantados separadamente dentro de tubos de polietileno de 10 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro, estéreis, no tecido subcutâneo de ratos com controle do experimento em intervalos de 3, 7, 15 e 30 dias. Em cada dia, 6 ratos foram utilizados, sendo 3 com implante das substâncias em quatro sítios localizados no dorso dos animais e 3 animais sham onde se implantou os tubos de polietileno vazios para observar-se a possibilidade de contribuição destes tubos em reação inflamatória desencadeada no tecido subconjuntivo. Os animais experimentais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina e xilazina (0,75ml/gr de peso). Foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados com overdose do mesmo anestésico. Realizou-se biópsia excisional da área do implante, com até 10 mm de limite de segurança, seguindo um plano de cortes histológicos aleatórios e uniformemente isotrópicos, cortes conhecidos como ORIENTATOR dentro dos princípios da estereologia. Obteve-se então uma estimativa estatística da quantidade relativa de células inflamatórias presentes ou não dentro do sistema teste, obtendo-se como resultado a biocompatibilidade da pasta, sendo o óxido de zinco o elemento mais tóxico pela qualidade das células encontradas.

**Palavras chaves:** Teste de materiais, tetraciclina, tianfenicol, óxido de zinco, materiais dentários.



## ABSTRACT

The purpose of this in vitro study was to evaluate the antimicrobial effects and biocompatibility of triple endodontic paste prepared with tetracycline (8mgr), thiamphenicol (26.67mgr) and zinc oxide (1.25) and used at Londrina University Dental School. Seven microbial strains (*Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*) obtained from the American Type Culture Collection were inoculated in Mueller Hinton (Difco Laboratories) agar and broth, and incubated at 37°C for 24hs. Cotton swabs charged with a bacterial or fungal suspension ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) were inoculated on Muller Hinton agar plates containing 5 wells (7.0 mm diameter cut in the agar gel). Each well was then filled with the following amounts of the endodontic paste and their individual components dissolved in 50µl of dimethyl sulfoxide (DMSO). Calcium hydroxide (8 mg dissolved in 50µl of DMSO) was also tested. In addition, two concentrated oil compounds were tested, tricresol formalin and camphorated paramonochlorophenol. Tetracycline was considered as the positive control and DMSO as the negative control. The plates inoculated with aerobic bacteria were incubated at 35°C for 20 h under normal atmosphere. Those inoculated with anaerobic bacteria were incubated anaerobically using an Anaerobic Gas Pak System (Becton, Dickinson & Co Sparks, MD) at 35°C for 72hs. All materials induced growth inhibition zones. Zinc oxide and calcium hydroxide demonstrated a low level of antimicrobial activity. Zones of inhibition induced by tricresol formalin and camphorated paramonochlorophenol were similar to that shown by the endodontic paste. An important requirement for endodontic paste with antibiotics placed in direct contact with living tissues is biocompatibility. The paste and its components were implanted separately through polyethylene sterile tubes of 10 mm in length and 1.3 mm in diameter, in the subcutaneous tissue of rats with the experiment control at intervals of 3, 7, 15 and 30 days. Each day 6 rats were used, being 3 of them with implant of the substances in four sites placed on the back of the animals and 3 sham animals where it was implanted the polyethylene empty tubes. The experimental animals were anesthetized in an intra-peritoneal way with ketamina and xilazina (0.75 ml / g body weight). After the experimental periods, the animals were anesthetized with the same anesthetic overdose. It was held an excision biopsy of the implant area with 10 mm to the security limit included in paraffin following a plan of random histological cut and uniformly isotropic or ORIENTED cuts according to stereological principles, getting a statistical estimative of the relative amount of inflammatory cells or not on the test system, getting as a result the paste biocompatibility, being the zinc oxide the most toxic element for the cell quality found.

**Key words:** materials test, tetracycline, thiamphenicol, zinc oxide, dental materials.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ADT:** Teste de difusão do ágar

**H/E:** Hematoxilina e eosina

**ISO:** International Organization for Standardization

**ZOE:** Óxido de zinco e eugenol

**FDI:** Federation Dentaire Internationale

**ISO:** International Standards Organization

**ADA:** American Dental Association

**CTZ :** cloranfenicol, tetraciclina e óxido de zinco.

**3 Mix:** metronidazol, ciprofloxacina e minociclina.

**ATCC :** American Type Culture Collection, Rockville

**DMSO:** dimetil sulfoxido

**EP:** pasta endodôntica

**Ca (OH)<sub>2</sub>:** hidróxido de cálcio PA

**TCF:** Tricresol formalina

**PMCF:** Paramonoclorofenol canforado

**TTZ :** Pasta pesquisada

**OZE :** Óxido de zinco

**GLI :** Cloranfenicol

**TET:** Tetraciclina

**UFC:** Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 METODOLOGIA .....</b>	<b>17</b>
<b>REFERÊNCIAS (DA DISSERTAÇÃO).....</b>	<b>28</b>
<b>2 ARTIGOS .....</b>	<b>31</b>
2.1 VERSÃO EM PORTUGUÊS ARTIGO NÚMERO 1 .....	31
2.2 VERSÃO EM INGLÊS ARTIGO NÚMERO 1.....	43
2.3 VERSÃO EM PORTUGUÊS ARTIGO NÚMERO 2.....	55
2.4 VERSÃO EM INGLÊS ARTIGO NÚMERO 2.....	77
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>97</b>
<b>A – Tabelas 2 com a contagem de células.....</b>	<b>98</b>
<b>B - Tabela 3 com as medidas das áreas de inflamação.....</b>	<b>99</b>
<b>C - Fotomicrografias das lâminas de histologia.....</b>	<b>100</b>
<b>D – Produção científica durante o mestrado.....</b>	<b>107</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>
<b>A – Parecer do comitê de ética – UFSC.....</b>	<b>110</b>
<b>B – Declaração de sigilo de dados coletados na pesquisa.....</b>	<b>111</b>
<b>C - Metodologia expandida da técnica histológica.....</b>	<b>112</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Acredita-se que a odontologia como especialidade surgiu por volta de 3000 antes de Cristo.

O principal objetivo da odontologia é manter ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Este objetivo pode ser conseguido pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, aperfeiçoamento da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética e pela melhor aparência (ANUSAVICE, 2005). Para alcançar muito desses objetivos há a necessidade da reposição ou alteração da estrutura dentária existente. Sendo assim, o principal desafio tem sido o desenvolvimento e a seleção de materiais que sejam biocompatíveis e que suportem as condições adversas do sistema estomatognático, entre elas as inúmeras bactérias que compõem a flora bucal. Para Estrela (2005), biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízos aos mesmos. Para uma correta avaliação dos materiais odontológicos, uma série de metodologias foram regulamentadas e padronizadas por organizações governamentais ou não como: Federation Dentaire Internationale, (FDI), International Standards Organization (ISO), e American Dental Association (ADA).

Os testes a serem aplicados para cada tipo de material são selecionados de acordo com o local de aplicação e com os riscos envolvidos e são divididos em três níveis: testes iniciais de toxicidade, testes secundários, relacionados à toxicidade tecidual local e, testes de aplicação ou pré-clínicos.

Segundo Estrela (2005), para avaliar a biocompatibilidade dos materiais odontológicos não é necessário que se desenvolvam todos os protocolos de pesquisa descritos no Quadro 1 a seguir, mas que o pesquisador possa selecionar pelo menos um protocolo de

cada um dos três níveis (“inicial”, “secundário” e de “aplicação”). Nesta pesquisa inicial, faremos um teste de implantação subcutânea e um antibiograma de uma pasta endodôntica com antibióticos, manipulada inicialmente por Cappiello em 1959. Segundo a ADA, 1982, o material a ser estudado aqui é classificado como Tipo III, Materiais Endodônticos. (ESTRELA, 2005)

**Quadro 1 - Testes recomendados para a avaliação biológica dos materiais dentários**

Teste inicial	Teste secundário	Teste de aplicação
1-Citotoxicidade	1-Irritação da membrana mucosa	1- Irritação da polpa
2-Hemólise	2-Toxicidade dérmica por exposição repetida	2- Capeamento pulpar
3-Teste de Ames	3-Implantação subcutânea	3-Aplicação em endodontia
4-Teste de Styles	4-Implantação em tecido ósseo	4- Implante dental
5-Dose Letal	5-Sensibilização	
6-Toxicidade Aguda LD50 Oral		
7- Toxicidade Aguda IP-LD 50		
8-Inalação Aguda		

Fonte: Metodologia científica, Estrela, 2005.

A invasão bacteriana ou de seus bioprodutos da polpa resultam em necrose pulpar e infecção, constituindo uma forte reação defensiva nos tecidos periapicais que prevêm a disseminação de patogenias circunvizinhas ao canal radicular. Microorganismos viáveis permanecem depois da preparação do canal radicular e desinfecção, contribuindo significativamente para falência da terapia endodôntica (ROSENTHAL et al., 2004; MELKER et al., 2006). Os tratamentos endodônticos são feitos para controlar a infecção e obtenção da

saúde dos tecidos periradiculares (HOELSCHER et al., 2006; MANZUR et al., 2007). O sucesso dos tratamentos endodônticos, portanto, é diretamente influenciado pela eliminação dos microorganismos nos canais radiculares infectados.

As espécies individuais da microbiota endodôntica são usualmente de menor virulência, mas coletivamente elas são patogênicas devido à combinação de fatores que facilitam a manutenção de infecções polimicrobianas (SELTZER et al., 1994; ESTRELA et al., 2001; WINDLEY et al., 2005) compreendendo bactérias anaeróbicas e anaeróbicas facultativas (SUNDQVIST, 1976; TRONSTAD et al., 1990; BAUNGARTNER et al., 1991; SUNDE et al., 2002; DESAI et al., 2004). Foi relatado recentemente que as bactérias mais comumente encontradas em canais com insucesso endodôntico são *Enterococcus*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium* e *Actinomyces* (MELKER et al., 2006). Em lesões endodônticas, além de bactérias anaeróbicas também são encontradas espécies fúngicas (BEZERRA DA SILVA et al., 2002).

Remover todas as bactérias do canal antes da obturação tem sido comprovadamente difícil e estudos na literatura tem explorado as vantagens de usar materiais obturadores com propriedades antimicrobianas para prevenir a contaminação bacteriana depois de procedimentos endodônticos (SUNDE et al., 2002; WINDLEY et al., 2005; MELKER et al., 2006; HOELSCHER, et al., 2006).

A associação de antibióticos a materiais dentários utilizados em endodontia é relatada desde a década de 60, pois em 1959, Cappiello e Soler começaram a fazer na Argentina tratamento endodôntico de dentes decíduos utilizando uma pasta composta de tetraciclina e óxido de zinco e eugenol a qual era colocada na câmara pulpar em sessão única sem que fosse feita qualquer intervenção nos condutos radiculares obtendo resultados clínicos positivos. Também na mesma época Shay (1960) analisou a possibilidade de usar antibióticos para conservação da vitalidade pulpar e Perdiza (1964) estudou a associação do óxido de

zinco ao cloranfenicol observando aumento no efeito do primeiro nos tratamentos endodônticos. A terapia com a pasta de Cappello é realizada na Universidade Estadual de Londrina com resultados surpreendentes desde 1962 (WALTHER, 1965).

Em 1994, Costa et al., estudaram e testaram a biocompatibilidade da pasta de Cappello com eugenol na composição, tendo como controle a pasta de óxido de zinco e eugenol, as quais foram implantadas no dorso de animais, utilizando-se para tal, tubos de polietileno de 10 mm de comprimento. Este estudo foi repetido por Ajimura et al., (2002), que removeram o eugenol da fórmula inicial e observou-se aumento na toxicidade da pasta.

Outros estudos têm sido feitos para investigar a resposta dos tecidos aos materiais dentários e por extensão às pastas endodônticas. A implantação de materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais é o teste secundário mais amplamente utilizado para testar a biocompatibilidade dos materiais (COSTA et al., 1994; AJIMURA et al., 2002; ESTRELA, 2005; SOUZA et al., 2005).

Oliveira e Zamperini (2007), em uma avaliação biológica, em tecidos conjuntivos de ratos, de materiais odontológicos utilizados para proteção pulpar verificaram que todos os materiais foram irritativos ao tecido conjuntivo nos períodos iniciais e o Hydical apresentou melhores resultados biológicos.

Takahashi et al., (2007), analisaram em ratos as respostas teciduais às pastas de Guedes Pinto (iodofórmio, PMCC e Rifocort) e hidróxido de cálcio. A pasta de Guedes Pinto causou menor edema e proporcionou menor inferência no processo de reparo.

Quanto aos testes de comparação por métodos experimentais da eficácia antimicrobiana, Amorim et al.,(2006), testou diferentes pastas de obturação endodôntica usadas em odontopediatria e demonstrou que todos os materiais de obturação de canal radicular induzem a formação de zonas de inibição em Agar, à exceção do Vitapex.

Hoelscher et al.,(2006) estudou in vitro os efeitos antimicrobianos de cinco antibióticos (amoxicilina, penicilina, clindamicina, metronidazol e doxiciclina) quando adicionados ao cone de guta percha obturador do tipo Kerr EWT. Os resultados revelaram que as combinações do cone obturador com amoxicilina, penicilina, clindamicina ou doxiciclina tiveram uma diferença significativa nas áreas de inibição frente ao *Enterococcus faecalis* quando comparadas ao cone obturador do tipo Kerr EWT isolado.

Tavares et al., (2007), avaliaram a atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, do metronidazol e da ciprofloxacina sobre o *Enterococcus faecalis* e observaram que a ciprofloxacina foi o antimicrobiano mais eficiente.

Barja-Fidalgo et al., em 2007 analisaram a ação antimicrobiana in vitro de 5 pastas utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos sendo que as pastas CTZ e 3 Mix, com antimicrobianos, tiveram resultados melhores, com maiores halos de inibição ao crescimento bacteriano.

Na pasta, com antibióticos, pesquisada neste estudo, entre seus componentes, temos a tetraciclina. Esse antimicrobiano atua contra um grande número de bactérias. Liga-se em graus variados às proteínas plasmáticas, inibindo a síntese protéica pelas bactérias. Tem atividade contra microorganismos Gram (+) e Gram (-), bactérias anaeróbicas, anaeróbicas facultativas e espiroquetas (WINDLEY et al., 2005).

O tianfenicol é um antifúngico de amplo espectro ativo contra microorganismos Gram (+) e Gram (-), agindo por inibição da síntese de proteínas (LORIAN AND GEMMELL, 1996).

A efetividade antimicrobiana do óxido de zinco e eugenol é primariamente resultante da potente ação antibacteriana do eugenol, segundo demonstrou Hume em 1986. Entretanto, Koulaouzidou et al., (2005), demonstrou ação citotóxica do óxido de zinco. Porém, ao contrário destas afirmações Kielbassa et al., (2007), mostraram que a pasta de óxido de zinco



e eugenol pode induzir a formação de cápsula fibrosa que previne a reabsorção, enquanto Craig et al., (2002), demonstraram que os cimentos de óxido de zinco tem pH neutro e são sedativos para a polpa, sendo portanto pouco irritantes.

Assim, a partir das informações obtidas da literatura associada ao uso clínico já realizado na Universidade Estadual de Londrina, o objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade e a atividade antimicrobiana da pasta endodôntica composta por tetraciclina, tianfenicol e óxido de zinco e seus componentes em separado.

## 2 METODOLOGIA

### • PADRONIZAÇÃO DA PASTA

Inicialmente foi feita a padronização da quantidade de pasta a ser implantada nos animais e nos testes de antibiograma. Estabeleceu-se que seria a quantidade colocada normalmente na câmara pulpar da maioria dos dentes molares decíduos que corresponde a 0,365 g. Para se chegar a este peso, misturamos empiricamente os componentes da pasta até obtermos a consistência preconizada pela Universidade Estadual de Londrina. Após, foi pesada a quantidade de cada componente necessário para obter a consistência desejada.

Usamos na fórmula farmacêutica da pasta os seguintes produtos:

Cápsula de Tianfenicol 500 mg (lecitina de soja, óleo vegetal hidrogenado, cera de abelha, óleo vegetal qsq) (Zamboni).

Cápsula de Tetraciclina 500 mg (fosfato complexo de tetraciclina), (Bristol-Myers Squibb).

Óxido de Zinco puro (K-DENT).

Para obter a mesma consistência da pasta preconizada por Cappiello e usada em Londrina as quantidades de cada produto foram:

- 0,7225 g do gel da cápsula de Glitizol
- 0,2187 g do pó contido na cápsula de tetraciclina
- 0,0338 g de pó de óxido de zinco puro obtendo-se:
- 0,9748 g de pasta (figura 1)

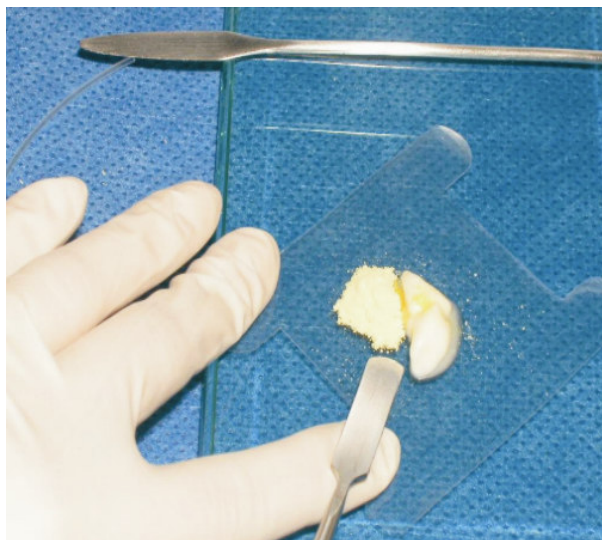


Figura 1 - Manipulação dos componentes da pasta

Após calculou-se em separado a quantidade de cada produto usado em 0,365 g de pasta (quantidade aplicada na câmara pulpar de molares decíduos). O valor de 0,365 g foi arredondado para APROXIMADAMENTE 36 mg.

Sendo assim chegamos às seguintes quantidades dos produtos:

- 8,0 mg de tetraciclina
- 26,67mg de glitizol
- 1,25 mg de óxido de zinco

- **IMPLANTAÇÃO DOS TUBOS DE POLIETILENO NO DORSO DE RATOS**

**Antes dos procedimentos experimentais, fizemos experimento piloto com 5 animais para escolha da metodologia e procedimentos laboratoriais que permitissem a execução da técnica diminuindo os vieses típicos de qualquer experimento biológico laboratorial.** O presente trabalho foi aprovado pela CEUA-UFSC (número PP00095).

O teste de implantação de materiais em tecido conjuntivo subcutâneo de animais é o teste secundário mais amplamente utilizado para testar a biocompatibilidade dos materiais (ESTRELA, 2005; SOUZA et al., 2005; AJIMURA et al., 2002; COSTA et al., 1994) e o recomendado por associações internacionais para materiais utilizados para terapia pulpar e obturadores endodônticos. (ESTRELA, 2005)

#### **Animais**

Foram utilizados 24 ratos Wistar, com 200 a 300 g divididos em 4 grupos experimentais com 6 animais em cada um deles, sendo 3 operados e 3 shams ( controle). Cada grupo de animais foi analisado em períodos de 3, 7, 15 e 30 dias .

#### **Procedimento cirúrgico para implantação da pasta endodôntica e de seus componentes**

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados usando técnica asséptica, sob anestesia profunda, induzida pela injeção i.p. de ketamina e xilazina (0,75 ml/gr de peso). No local determinado para cada sítio foi feita uma incisão de 18 mm de comprimento e 08 mm de profundidade (figuras 2, 3, 4) de forma a abraçar com conforto os tubos de polietileno,contendo os materiais experimentais, evitando-se somatizar qualquer reação inflamatória. Não houve perda de nenhum animal por decorrência da técnica cirúrgica ou processos infecciosos. Os animais não foram medicados com antibióticos após as cirurgias.

Os materiais experimentais na forma de pó (tetraciclina e óxido de zinco) foram

dissolvidos em solvente neutro TUIN, escolhido durante o experimento piloto, em concentração adequada, baseados em literatura específica e de acordo com protocolo do departamento de Ciências Fisiológicas da UFSC, para não afetar as propriedades dos materiais em teste ou induzir reações inflamatórias paralelas aos produtos da fórmula.. Esta mistura foi executada de forma a permitir a introdução destes materiais nos tubos de polietileno.

O tianfenicol (gel) a pasta e os demais materiais foram introduzidos nos tubos com a utilização de seringas de insulina estéreis. Para evitar o extravazamento uma das extremidades dos tubos foi fechada a quente. Com auxílio de uma pinça, os tubos de polietileno contendo a pasta endodôntica, e os seus componentes em separado, foram implantados no dorso dos animais de acordo com a sequência representada na figura 1. Nos animais sham apenas os tubos foram implantados. Cada tubo de polietileno, 10 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro (figura 5), foi posicionado paralelo à incisão com a abertura direcionada para a cabeça do animal. Em seguida o tecido foi reposicionado e a pele suturada com fio de sutura 3.0. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram sacrificados por overdose do mesmo anestésico, e a biópsia excisional da área dos tubos implantados foi realizada.

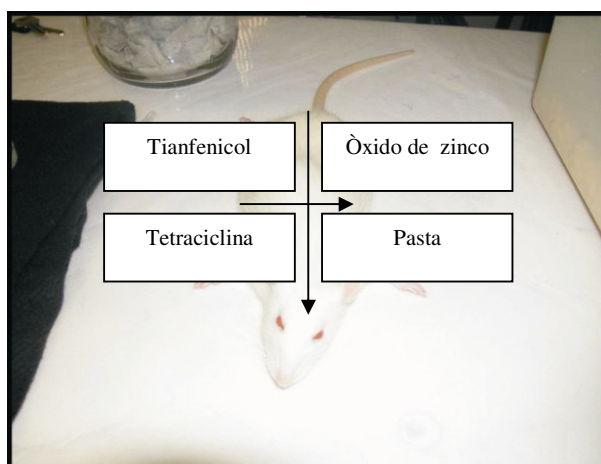


Figura 2 - Esquema dos implantes feitos no dorso dos animais experimentais

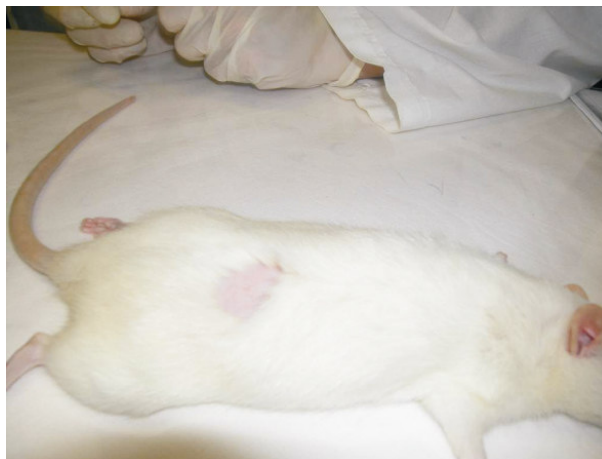


Figura 3 -Tricotomia realizada previamente às cirurgias



Figura 4 - Imagem de uma loja cirúrgica feita no dorso dos animais para os implantes ,com 08 mm de profundidade



Figura 5 - Tubos de polietileno cortados com 10 mm de comprimento e diâmetro interno de 1,3 mm para efetuar os implantes.

- **TÉCNICA HISTOLÓGICA**

O método mais comumente usado em histologia é o método que permite a obtenção de preparados histológicos permanentes, as lâminas, para estudo em Microscopia Óptica.

A preparação das lâminas usadas neste estudo foi feita de acordo com o protocolo seguido no Laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Morfológicas da UFSC descrito em detalhes no anexo C.

1- Obtenção do Material

A maneira de execução das biópsias dos tecidos conjuntivos, onde foram feitos os implantes de pasta ou de seus componentes isolados, é de fundamental importância para possibilitar a correta confecção das lâminas que possibilitaram alcançar o objetivo proposto.

2- Redução das Peças (macroscopia)

É o primeiro procedimento, onde os órgãos extraídos são seccionados em fatias

menores a fim de serem levados ao fixador, no menor espaço de tempo possível, a fim de evitar autólise. Nesta etapa do processo é crucial que o pesquisador tenha cuidado em fornecer uma superfície de corte do órgão a ser incluído em parafina. Tal fato possibilita que durante o processo de microtomia o pesquisador saiba exatamente qual o plano de corte a ser empregado. No presente estudo os cortes foram feitos em dois níveis para seguirmos os preceitos da estereologia, cortes chamados orientador, permitindo a contagem de células inflamatórias em extensão, profundidade e espessura nas biópsias (BRIARTY, L, 1975; MANDARIM DE LACERDA, 2002).

### 3 - Técnica Histológica

Para o preparo das lâminas, os órgãos precisam ser reduzidos a cortes (fatias extremamente delgadas de um pequeno fragmento de tecido), que permitam a sua visualização ao microscópio óptico. Estes cortes são feitos com um instrumento denominado micrótomo. O que se deseja é levar ao Microscópio um preparado no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos..

Após o processamento das peças fez-se a fixação, Denominam-se fixação, aos procedimentos que visam manter de modo definitivo as estruturas citológicas e histológicas dos vários tecidos. Em outras palavras, a fixação visa evitar a deterioração dos tecidos que permitem a realização das inúmeras técnicas citológicas e histológicas para o estudo das células e tecidos.

Nesta pesquisa utilizamos o formol a 10% por 48 horas.



- **PROCESSAMENTO DA PEÇA:**

As peças cortadas ficaram imersas em soluções de álcool absoluto, para desidratação, xilol para diafanização e parafina para inclusão, em tempos considerados padrão para a técnica.

- **INCLUSÃO**

É o procedimento que tem como finalidade impregnar os tecidos com uma substância de consistência firme que permita em etapa posterior cortá-los em fatias finas para depois corá-los, possibilitando assim a sua visualização no microscópio.

Várias substâncias são utilizadas para a inclusão, como por exemplo, a celoidina, parafina, gelatina, carbowax, etc. Carbowax é o nome comercial de uma cera sintética hidrossolúvel.

Pelo fato de ser mais simples e dar bons resultados, a quase totalidade das inclusões é feita em parafina. Nesta pesquisa utilizamos a parafina.

- **MICROTOMIA**

É esta a etapa mais importante e difícil da técnica histológica, e consiste basicamente em obter cortes sucessivos dos blocos de parafina contendo fragmentos de órgão. Estes cortes são obtidos com o uso do micrótomo que consta essencialmente de uma navalha de aço especial muito bem afiada e um braço, ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente para cima e para baixo, fazendo os cortes. Nesta pesquisa os cortes seriados

foram feitos de 500 em 500 micrometros até o desaparecimento de reação inflamatória ,ao longo dos cortes histológicos, para cada substância implantada.

- **PREPARO PRÉVIO DAS LÂMINAS QUE VÃO RECEBER OS CORTES**

- 1) É importante usar lâminas limpas para colher os cortes. Recomenda-se a imersão das lâminas em detergentes, sua lavagem em água e estocagem em álcool 80%. Antes de usar, as lâminas são secas com pano de fralda e guardadas.
- 2) Às vezes os cortes têm uma tendência a se desprenderem da lâmina durante a coloração. Para evitar isto é habitual revestir a superfície que vai entrar em contato com o corte, com uma delgada camada de proteína. As proteínas utilizadas são a albuminas do ovo e a gelatina. Nets pesquisa utilizamos gelatina.

- **COLORAÇÕES**

A coloração dos tecidos é uma etapa indispensável para poder estudar com eficiência os cortes no microscópio óptico, e consiste geralmente em corar de diferentes cores, estruturas presentes nos cortes previamente incolores. No presente estudo as lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina.

### **MONTAGEM**

- Montar com Entelan ou Bálsamo do Canadá.
- Colocou-se uma gota de entelan numa lamínula e colocou-se a lâmina com o corte já colorido em cima. Tirou-se todo ar ou bolha que havia entre a lâmina e lamínula e

deixamos secar. Este procedimento visa conservar indefinidamente os cortes histológicos e a visualização no microscópio óptico.

## ESTEREOLOGIA

Após a confecção das lâminas, obtivemos um universo histológico de 415 cortes distribuídos em 83 lâminas e executou-se a contagem de células inflamatórias visíveis no tecido conjuntivo dos animais experimentais, em cinco áreas aleatórias, escolhidas em cada dia de controle para cada substância implantada, fazendo-se então uma estimativa estatística seguindo-se os princípios da estereologia, ciência matemática baseada em estatística, que trabalha com acurácia (MANDARIM DE LACERDA, 2002). O trabalho foi executado no departamento de ciências morfológicas da UFSC e os resultados são demonstrados nos apêndices A e B e visíveis no apêndice C que contém fotomicrografias das lâminas de histologia.

## ANTIBIOGRAMA

Para avaliar os efeitos antimicrobianos da pasta endodôntica tripla preparada com tetraciclina (8 mg), tiafenicol (26,67 mg) e óxido de zinco (1,25 mg), sete espécies de microorganismos (*Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans*) foram inoculadas em ágar e em caldo de Muller Hinton, e incubados a 37°C durante 24 horas. “Swab” carregados com a suspensão de bactérias ou fungos ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) foram inoculados nas placas contendo ágar Muller Hinton com 5 poços (7,0 milímetros de diâmetro cortados dentro do gel). Cada poço foi preenchido posteriormente, com quantidades da pasta

endodôntica e de seus componentes individuais dissolvidos em 50 µl de dimetil sulfóxido (DMSO). O hidróxido de cálcio (8 mg dissolvido em 50 µl de DMSO) também foi testado. Além destes, foram testados o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado. As placas inoculadas com bactérias aeróbicas foram incubadas em 35°C por 20 horas. Aquelas inoculadas com as bactérias anaeróbicas foram incubadas **usando um sistema anaeróbico** GasPak a 35°C por 72 horas em jarras de anaerobiose.( Fig. 6 e 7)

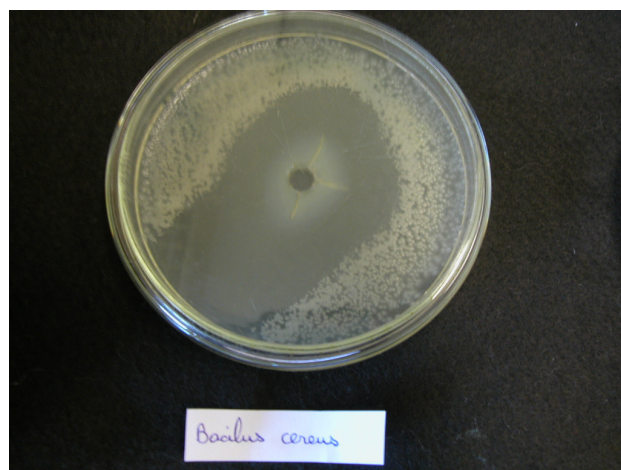


Fig. 6-Placa de Petri com cultura de Bacillus Cereus no Agar De Muller Hinton



Fig.7-Jarra de anaerobiose para trabalhos com as bactérias anaeróbicas

## REFERÊNCIAS

- ANUSAVICE KJ. Materiais Dentários Philips. Elsevier; 2005.
- ESTRELA,C. Metodologia Científica. Artes Médicas; 2005.
- ROSHENTHAL S, SPANGBERG I, SAFAVI K. Chlorexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod 2004; 98:488-492.
- MELKER KB, VERTUCCI FJ, ROJAS MF, PROGULSKE- FOX A, BÉLANGER M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. J. Endodontics. 2006, 32:148-151.
- HOELSHERRAA, BAHCALL JK, MAKI JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal-sealer-antibiotic combination against enterococcus faecalis. J Endod 2006; 32:145-147.
- MANZUR A, GONZALES AM, POZOS A, SILVA-HERZOG D, FRIEDMAN S. Bacterial qualification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: A randomized clinical trial. J Endod 2007; 33:114-118.
- SELTZER S, FARBER PA. Microbiologic factors in endodontology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78:634-645.
- ESTRELA C, BAMMANN LL,P IMENTA FC, PECORA JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. Int Endod J 2001; 34: 341-345.
- WINDLEY W, TEIXEIRA F, LEVIN L, SIGURDSSON A, TROPE M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. JOE. 2005, v.31 (6).
- SUNDQUIVIST G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Dissertation). Umea, Sweden: University of Umea, 1976.
- SIQUEIRA, JF. Treatment of endodontic infections. 1a. ed., Rio de Janeiro: MedsiOdontological Dissertations 1997.
- TRONSTAD L, BARNETT F,CERVOVE F;Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment., Dental Traumatology,1990,6:73-77.
- BAUGARTNER JC, FALKLER JR WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endodontics. 1991, 17:380-383.
- SUNDE PT, OLSEN I, DEBELIAN GJ, TRONSTAD L. Microbiota of Periapical Lesions Refractory to endodontic therapy. J Endodontics. 2002, 28:304-310.
- DESAI M, GULABIVARA K, Ng YL, SPRATT D. Co-aggregation studies on bacteria from infected root canals. Int Endodontics Journal. 2004, 37:345-34.

MELKER KB, VERTUCCI FJ, ROJAS MF, PROQULSKE-FOX A, BELANGER M.  
Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. J Endod 2006; 32:148-151.

SILVAL.A.B.,PERASSI F.T.,IROI.Y.,YAMASHITA J.C.,BONIFÁCIO .C.,TANOMARU FILHO M., A presença de fungos nas infecções endodônticas, UNIMEP, v12, n 1 e 2 jan./dez, 2000.

CAPPIELLO J. Nuevos enfoques em odontologia infantil. Rer. Circ.Odonto Rosário,v.52,p.138-145,1964.

SHAY, D.E, Uso de antibióticos para conservação da vitalidade pulpar, J. den Children,p .27-35,1960.

PERDIZA W. Tratamento conservador da polpa. Bol. da F.F. O. Rib. Preto. 1964, p.137-140.

WALTHER, L. F. Odontologia e comunidade , p 6-11, 1965.

COSTA CAS, BENATTI NETO C., ABDALLA RE, GONZAGA HFS,LIA RCC. Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecido subcutâneo de rato. Rev. Odont. Univ. São Paulo. 1994, 8:65-70.

AJIMURA KT, FERELLE A, AKATSU T. Estudo comparativo da biocompatibilidade de um cimento à base de antibiótico contendo tianfenicol, tetraciclina e óxido de zinco com cimento de óxido de zinco e eugenol, em tecido subcutâneo de rato. XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá (PR), 2002.

SOUZA SMG, BRAMANTE CM, TAGA EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and Citric Acid. Braz Dent Journal, n 16, p 3-8, 2005.

OLIVEIRA MRB, ZAMPERINI CA. Avaliação biológica em tecidos conjuntivos de ratos de materiais odontológicos utilizados para proteção pulpar. Braz Oral Res. 2007, 21:3163-

TAKAHASHI K, DEZAN-JUNIOR E, CUNHA RF. Avaliação da Resposta Tecidual às pastas Guedes Pinto e de Hidróxido de Cálcio, Análise Edemogênica e ao Microscópio óptico em ratos, Braz Oral Res. 2007, 21:310.

AMORIM LFG, TOLEDO OA,E STRELA CRA, DECURCIO DA, ESTRELA C.  
Antimicrobial analysis of different root canal fillings pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. Braz Dent J. 2006, 17:317-322.

TAVARES AR, BEUMER J, PEREIRA RR, MASIERO AV, Atividade antimicrobiana do hidróxido de cálcio, metronidazol e ciprofloxacina (CFC) sobre o Enterococcus faecalis;Braz Oral Res. 2007,53.

BARJA-FIDALGO F. et al, Avaliação da ação antimicrobiana in vitro de 5 pastas utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos., Brazilian Oral Research. Vol.21, sep. p311, 2007.

LORIAN V, GEMMELL CG. Effects of low concentrations of antibiotics on bacterial ultrastructure, virulence and susceptibility to immunodefenses: clinical significance. En: Lorian V (ed). Antibiotics in Laboratory Medicine. 4ª edición. Williams & Wilkins. Baltimore, 1996. pp. 397-452.

HUME WR. The pharmacology and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. J Am Dent Assoc 1986; 113:789-791.

KOULAZIDOU EA, KONSTANTINOS TP, ECONOMIDES NA, PANAGIOTIS B, KORTISARIS AH. Antiproliferative effect of mineral trioxide aggregate, zinc oxide-eugenol cement and glass ionomer cement against three fibroblastic cell lines. J Endodontics. 2005, 31:44-46.

KILBASSA AM, UCHTMANN H, WRBAS T, BITTER K. In vitro study assessing apical leakage of sealer-only backfills in root canals of primary teeth. J Dentistry. 2007, 35.

CRAIG R G, POWERS J M., WATAHA J C., Materiais Dentários, Propriedades e Manipulação , 7 edição. Ed. Santos, 2002. 123-125.

BRIARTY LG. Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy, Sci. Prog. 1975, 1-32.

MANDARIM DE LACERDA C.A. Stereological tools in biomedical research, Acad. Bras. Cienc. 469-86, 2003)

## 2 ARTIGOS

### 2.1 VERSÃO EM PORTUGUÊS ARTIGO NÚMERO 1

#### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DA PASTA ENDODÔNTICA PREPARADA COM TETRACICLINA, TIANFENICOL E ÓXIDO DE ZINCO NO MÉTODO DA DIFUSÃO EM ÁGAR.**

Elisabeth Cristina Gomes de Mattos<sup>1</sup>; Marcelo Carvalho Chain<sup>1</sup>; Adair Roberto Soares dos Santos<sup>2</sup>; Elza de Fátima Albino Smânia<sup>3</sup>; Artur Smânia Junior<sup>3</sup>; Rubens Rodrigues Filho\*<sup>1</sup>

1 Departamento de Estomatologia; 2 Departamento de Ciências Fisiológicas e 3 Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Autora para correspondência: Elisabeth Cristina Gomes de Mattos

Rua Artista Bittencourt, 160 apto. 203 – Centro – Florianópolis

CEP 88.020-060 – SC – Brasil

Telefone: +55 (048) 32242698

Endereço de e-mail: elisabethgm@hotmail.com

Artigo formatado segundo as normas da revista Brazilian Dental Journal.



## RESUMO

A finalidade deste estudo in vitro foi avaliar os efeitos antimicrobianos da pasta endodôntica tripla preparada com tetraciclina (8mg), tiafenicol (26.67mg) e óxido de zinco (1.25mg) utilizada na Universidade Estadual de Londrina, Faculdade de Odontologia. Sete tipos de microorganismos (*Bacilo cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* e *C.albicans*) obtidas da Coleção Americana de Cultura foram inoculadas no Agar e no caldo de carne de Mueller Hinton (laboratórios de Difco) e incubados a 35° C durante 24hs. Os cotonetes de algodão carregados com o caldo das bactérias ou fungos em suspensão ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) foram inoculados nas placas de Agar de Hinton Muller que continham 5 furos ( com diâmetro de 7.0 milímetros cortados dentro do gel do Agar). Cada um foi preenchido posteriormente, com as quantidades da pasta endodôntica e de seus componentes individuais dissolvidos em 50µl do dimetil sulfóxido (DMSO). O hidróxido de cálcio (8 mg dissolvido em 50µl de DMSO) foi testado também. Além disso, dois compostos foram testados concentrados, o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado. O controle positivo foi considerado a tetraciclina o negativo o DMSO. As placas inoculadas com bactérias aeróbicas foram incubadas em 35°C por 20 h na atmosfera normal. Aqueles inoculados às bactérias anaeróbicas foram incubados usando um sistema Anaeróbico de Gás Pak (Becton, Dickinson) em 35°C para 72hs. Todos os materiais induziram zonas da inibição do crescimento. Óxido de Zinco e hidróxido de cálcio demonstraram a atividade antimicrobiana pequena. As zonas da inibição induzidas para o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado eram similares àquela mostrada pela pasta endodôntica.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana; pasta de endodontia; microorganismos; tetraciclina.

## 1 INTRODUÇÃO

A invasão da polpa dental por bactérias ou seus bioprodutos resultam em necrose pulpar e infecção, constituindo uma forte reação defensiva nos tecidos periapicais que prevêm a disseminação de patogenias circunvizinhas ao canal radicular. Os tratamentos endodônticos são feitos para controlar a infecção e obtenção da saúde dos tecidos periradiculares (HOELSCHER et al., 2006; MANZUR et al., 2007).

O sucesso destes tratamentos é diretamente influenciado pela eliminação dos microorganismos nos canais radiculares infectados. Microorganismos viáveis permanecem depois da preparação do canal radicular e desinfecção, contribuindo significativamente para falência da terapia endodôntica (ROSENTHAL et al., 2004; MELKER et al., 2006). Estudos têm demonstrado que a microbiota dos canais radiculares dos dentes com falência de tratamentos endodônticos difere da que normalmente é encontrada em dentes tratados uma única vez. (MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PECLULIENE et al., 2001).

As espécies individuais da microbiota endodôntica são usualmente de menor virulência, mas coletivamente elas são patogênicas devido a combinação de fatores que facilitam a manutenção de infecções polimicrobianas (SELTZER E FABER, 1994; ESTRELA et al.; WINDLEY et al., 2005) compreendendo bactérias anaeróbicas e anaeróbicas facultativas (SUNDQVIST et al., 1976; TRONSTAD et al., 1987; BAUNGARTNER et al., 1991; SUNDE et al., 2002, DESAI et al., 2004).

Diferentes medidas têm sido propostas para reduzir o número de microorganismos nos canais radiculares, incluindo o uso de várias técnicas de instrumentação, métodos de irrigação e medicamentos intracanal (ROSENTHAL et al., 2004). Bactérias viáveis devem ser removidas dos canais radiculares depois de iniciado o tratamento por um processo de desinfecção efetiva. (AMORIM et al., 2006).

Por anos, o uso sistêmico e tópico de antibióticos têm sido utilizados em odontologia. Entretanto a administração sistêmica de um antibiótico, e a concentração encontrada no canal radicular, é pequena para ser benéfica. A maior vantagem dos antibióticos no local comparado com o uso sistêmico é que as consequências sistêmicas e complicações são prevenidas e concentrações substancialmente maiores podem ser utilizadas (GOODSON, 1989).

Especialmente em odontologia pediátrica, dificuldades no controle antimicrobiano requerem o uso de pastas obturadoras de canais radiculares com larga atividade antimicrobiana (AMORIM et al., 2006)

Cappiello (1964-1967) desenvolveu uma pasta antibiótica associada com o óxido de zinco e eugenol e obteve resultados melhores nas pulpotomias de dentes decíduos. Em outro estudo, Amorim et al.,(2006), comparou por dois métodos experimentais a eficácia antimicrobiana de diferentes pastas de obturação endodôntica dos canais radiculares usadas em odontologia pediátrica e demonstrou que todos os materiais de obturação destes canais induzem a formação de zonas da inibição, à exceção de Vitapex.

Hoelscher et al.,(2006) estudaram in vitro os efeitos antimicrobianos de cinco antibióticos quando adicionados ao cone de guta percha obturador Kerr EWT. Cinco antibióticos: a amoxicilina, a penicilina, a clindamicina, o metronidazol e a doxiciclina foram adicionados separados ao obturador da Kerr. Os resultados revelaram que as combinações do obturador-antibiótico que contêm a amoxicilina, a penicilina, a clindamicina, e a doxiciclina tiveram uma diferença significativa nas zonas médias da inibição quando comparadas ao obturador da Kerr EWT sozinho.

O objetivo deste estudo “in vitro” foi avaliar os efeitos antimicrobianos da pasta endodôntica preparadas com o óxido de zinco, tetraciclina e tianfenicol utilizada na Universidade de Londrina, faculdade de odontologia.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

### 2.1 MEDICAMENTOS

Tetraciclina (Bristol-Myers Squibb), Tianfenicol (Zamboni), óxido de Zinco (Biodinâmica), hidróxido de cálcio PA (Quimis Mallinkrodt), Tricresol Formalina (Inodon), Paramonoclorofenol Canforado (SS White).

### 2.2 PREPARAÇÃO DA PASTA ENDODÔNTICA

A pasta foi preparada com 8 mg de tetraciclina, 26.67 mg de Tianfenicol e 1.25mg de óxido de zinco. Os componentes da pasta endodôntica foram misturadas para obter uma consistência de pasta dental.

### 2.3 MICROORGANISMOS E DETECÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O estudo foi realizado de encontro aos seguintes microorganismos: *Bacilo cereus* ATCC 11778, *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e um fungo, *Cândida albicans* ATCC 14053 (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

As espécies aeróbicas foram incubadas em 35°C por 20 h. As culturas foram diluídas então no caldo de carne contendo  $10^5$  -  $10^6$  CFU/ml. O Agar de Mueller-Hinton e o caldo de carne (laboratórios de Difco) foram usados para o crescimento bacteriano e fungo. À exceção

do *F. nucleatum* e do *C. difficile* que foram incubados sob as circunstâncias anaeróbicas (35°C por 72 h), todos os outros foram incubados sob circunstâncias aeróbicas.

## 2.4 MÉTODO DA DIFUSÃO DO AGAR

Os cotonetes de algodão carregados com o caldo das bactérias ou a suspensão de fungos (105-106 UFC/ml) foram inoculados nas placas de Agar de Hinton Muller contendo 5 furos (diâmetro de 7.0 milímetros cortados dentro do Agar gel) (Smânia et al, 1995). Cada um foi preenchido posteriormente com as quantidades da pasta endodôntica e de seus componentes individuais dissolvidos em 50µl do sulfoxido dimetil (DMSO): Pasta- 37,5mg, tetraciclina 8mg, tianfenicol 26.6mg e óxido de zinco 1.2mg. O hidróxido de cálcio (8 mg dissolvido em 50µl de DMSO) foi testado também. Além disso, foram testados, o tricresol formalina e paramonoclorofenol canforado. O controle positivo foi considerado a tetraciclina e o negativo foi o DMSO. As placas inoculadas com bactérias aeróbicas incubadas em 35°C para 20h na atmosfera normal. Aqueles inoculados às bactérias anaeróbicas foram incubadas usando um sistema Anaeróbico GASPAC Sistema (Becton, Dickinson & Co Sparks, MD) em 35°C por 72 H. Um resultado positivo foi definido como uma zona de 9 milímetros ou de mais no diâmetro inibindo a tensão bacteriana ou de fungos.

## 3 RESULTADOS

Os resultados do teste da difusão do Agar são mostrados na tabela 1. Todos os materiais induzem zonas da inibição do crescimento. Óxido de zinco e hidróxido de cálcio demonstraram pequena atividade antimicrobiana. As zonas da inibição induzidas para o tricresol formalina e o paramonoclorofenol canforado foram similares àquela mostrada pela

pasta endodôntica. Quando comparado o tricresol formalina apresentou zona de inibição maior que o paramonoclorofenol canforado para os microorganismos testados.

Tabela 1: Diâmetros em mm das zonas de inibição no teste de difusão em Agar.

Bac Subst.	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. difficile</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>S. epidermis</i>
Tetracycline	50	50	40	20	40	30	40
zinc oxide	20	13	10	20	30	25	25
tianfenicol	40	40	50	26	50	40	40
<b>EP</b>	55	57	43	38	40	30	41
TCF	60	50	60	60	50	50	40
Ca(OH) <sub>2</sub>	16	28	10	18	13	15	13
PMCFC	40	35	40	42	40	30	44

**EP::** pasta endodôntica

Ca (OH)<sub>2</sub>: hidróxido de cálcio PA

TCF: tricresol formalina

PMCFC: paramonoclorofenol canforado

## 4 DISCUSSÃO

Os microorganismos são os fatores etiológicos mais importantes para a infecção endodôntica. A invasão bacteriana da polpa resulta na necrose pulpar e na infecção, constituindo uma reação de defesa nos tecidos periradiculares que impeça a disseminação dos patogênicos além do canal da raiz (MANZUR et al., 2007).

Nos dentes maduros, a desinfecção é realizada com uma combinação da instrumentação, da irrigação e da colocação de um medicamento intracanal. Embora desinfecção completa não seja conseguida com a instrumentação mecânica sozinha (WINDLEY et al., 2005).

A resolução completa da infecção pulpar requer a aplicação no canal radicular de materiais obturadores com propriedades antimicrobianas (AMORIM et al., 2006).

Neste estudo, o teste da difusão do Agar foi usado para avaliar a atividade antimicrobiana da pasta endodôntica preparada com tetraciclina, tianfenicol e óxido de zinco de encontro aos patogênicos endodônticos comuns. Medicamentos similares foram testados também. Este método de testar foi usado determinando as propriedades anti-bacterianas de obturadores endodônticos (COBANKARA et al., 2004).

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que todos os medicamentos induzem zonas de inibição do crescimento em várias espécies dos patogênicos. A pasta endodôntica apresentou atividade antimicrobiana forte. Diversos dentistas pediatras brasileiros usam pastas endodônticas com antibióticos, por exemplo, pasta de Guedes-Pinto, pasta de óxido do zinco e eugenol, pasta de hidróxido de cálcio e Vitapex com resultados clínicos bons. O uso de pastas endodônticas com antibióticos é indicado em dentes com anatomia complexa do sistema de canais radiculares que faz freqüentemente o tratamento completo impossível.

Mesmo após a limpeza, dar forma e irrigação com desinfetantes, a eliminação completa das bactérias é difícil de conseguir (STRÖM e SUNDQVIST, 1985). Conseqüentemente, as dificuldades no controle antimicrobiano requerem o uso de pastas de preenchimento dos canais da raiz com atividade antimicrobiana larga (AMORIM et al., 2006). Tetraciclina é um grupo de antimicrobianos bacteriostáticos de largo spectrum de atividade e eficaz de encontro à spiroquetas, e muitas bactérias anaeróbicas e facultativas. Agem pela inibição da síntese protéica nas superfícies dos ribossomos. Khademi et al., (2006)

demonstraram que a substantividade antimicrobiana da tetraciclina era significativamente maior do que o digluconato de clorexidina por 12 dias. A Guta-percha que continha tetraciclina inibiu o crescimento dos *Actinomyces*, do *Fusobacterium* e do *E.fecaelis* (MELKER et al., 2006). O tianfenicol é uma droga antifúngica e tem um spectrum largo da atividade de encontro aos microorganismos gram-positivos e gram-negativos, agindo pela inibição da síntese da proteína pelas bactérias. No estudo atual ambas as drogas inibiram o crescimento de todos os microorganismos testados.

Hidróxido de cálcio e óxido de zinco demonstraram a atividade antimicrobiana pequena no teste da difusão do Agar. As propriedades antimicrobianas do hidróxido de cálcio são atribuídas ao pH e a habilidades para destruir a membrana do citoplasma, desnaturalizando enzimas e danos ao DNA bacteriano. (SIQUEIRA e GALOPA, 1999). Não obstante, quando colocado dentro do canal da raiz apresentou eficácia limitada na eliminação das bactérias dos canais radiculares in vivo (SHUPING et al., 2000; MCGURKIN-SMITH et al., 2005). Além disso, outros estudos relataram o aumento na proporção das culturas positivas e das contagens bacterianas (KVIST et al., 2004; WALTIMO et al., 2005). Hume (1986) demonstrou que a eficácia antimicrobiana do ZOE é primeiramente um resultado do eugenol que é um agente anti-bacteriano potente, no contraste com nosso estudo que utilizou somente óxido de zinco.

O paramonoclorofenol canforado é um agente derivado fenólico que tem atividade bactericida, mas também altamente tóxica (AMORIM et al., 2004). Destroi as membranas citoplasmáticas bacterianas, desnatura proteínas e inativa enzimas. Adicionalmente, libera o cloro, um agente de oxidação forte que inativa enzima com grupos sulfídricos. (SIQUEIRA et al., 1996). Os resultados apresentados no estudo atual estão na concordância com estudos precedentes que promovem o contato direto do paramonoclorofenol canforado aos



microorganismos no teste da difusão do Agar (STEVENS & GROSSMAN, 1983, SIQUEIRA & UZEDA, 1986).

O tricresol formalina neste estudo demonstrou a atividade forte no teste da difusão do ágar para todos os patogênicos endodônticos testados, porém não é usado atualmente como um medicamento intracanal a longo prazo. É considerado um potente bactericida, mas com uma forte toxicidade para os tecidos periapicais. Menezes et al., (2004) demonstraram que o tricresol formalina não era eficaz de encontro à *Cândida Albicans*

Considerando que a completa resolução da infecção pulpar necessita de completa eliminação de patogênicos endodônticos e que vários medicamentos intracanal têm grande toxicidade, a combinação de antibióticos nas pastas endodônticas pode ser uma possível alternativa de tratamento.

## **CONCLUSÕES**

Em conclusão, os resultados obtidos no estudo atual demonstram a efetividade desta pasta endodôntica tripla e pode justificar o uso no tratamento de infecções pulpares, particularmente em odontologia pediátrica.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Amorim CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004; 18:242-246.
2. Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal fillings pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006; 17: 317-322.
3. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17:380-383.

4. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18:35-40.
5. Cappelletto J. Pulpar treatment in immature incisors. *Rev Circ Odontol* 1964; 52:138-145.
6. Cappelletto J. Nuevos enfoques em odontologia infantil. *Rev. Circ. Odontol* Rosário, v.52, p.138-145, 1964.
7. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 2004; 30:57-60.
8. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001; 34:341-345.
9. Goodson J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J. Dent Res* 1989; 68:1625-1632.
10. Hoescher AA, Bahcall JK, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal-sealer-antibiotic combination against enterococcus faecalis. *J Endod* 2006; 32:145-147.
11. Hume WR. The pharmacology and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J Am Dent Assoc* 1986; 113:789-791.
12. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantives of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006; 32:112-115.
13. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004; 30:572-576.
14. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial qualification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: A randomized clinical trial. *J Endod* 2007; 33:114-118.
15. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)<sub>2</sub>. *J Endod* 2005; 31:359-363.
16. Melker KB, Vertucci FJ, Rojas MF, Proquleske-Fox A, Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. *J Endod* 2006; 32:148-151.
17. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigates and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004; 37:311-319.
18. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of rootfilled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.

19. Pecluliene V, Reynauld AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34:429-434.
20. Rosenthal S, Spangberg I, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2004; 98:488-492.
21. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78:634-645.
22. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000; 26:751-755.
23. Siqueira JF Jr and Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-369.
24. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996, 22:674-676.
25. Smânia A, Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology* 1995, 45:177-181.
26. Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 1983; 9:372-374.
27. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28:304-310.
28. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Dissertation). Umea, Sweden: University of Umea, 1976. Apud Siqueira, JF. *Treatment of endodontic infections*. 1a. ed., Rio de Janeiro: Medsi Odontological Dissertations 1997.
29. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:86-93.
30. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3:86-90.
31. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year followup of periapical healing. *J Endod* 2005; 31:863-866.
32. Windley W 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005; 31:439-443.

## 2.2 VERSÃO EM INGLÊS ARTIGO NÚMERO 1

**In vitro Antimicrobial Activity of Endodontic Paste prepared with  
Tetracycline, Thiamphenicol and Zinc- oxide assessed using agar  
diffusion method**

Elisabeth Cristina Gomes de Mattos<sup>1</sup>; Marcelo Carvalho Chain<sup>1</sup>; Adair Roberto Soares dos Santos<sup>2</sup>; Elza de Fátima Albino Smânia<sup>3</sup>; Artur Smânia Junior<sup>3</sup>; Rubens Rodrigues Filho\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Stomatology; <sup>2</sup>Department of Physiology and <sup>3</sup>Department of Microbiology and Parasitology, University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Corresponding autor:: Elisabeth Cristina Gomes de Mattos

Rua Artista Bittencourt, 160 apto.203-Centro– Florianópolis

CEP 88.020-060– SC – Brasil

Telefone: +55 (048)32242698

E-mail: elisabethgm@hotmail.com

Artigo formatado segundo as normas da revista Brazilian Dental Journal

## ABSTRACT

The purpose of this in vitro study was to evaluate the antimicrobial effects of triple endodontic paste prepared with tetracycline (8mgr), thiamphenicol (26.67mgr) and zinc oxide (1.25) and used at Londrina University Dental School. Seven microbial strains (*Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*) obtained from the American Type Culture Collection were inoculated in Mueller Hinton (Difco Laboratories) agar and broth, and incubated at 37°C for 24hs. Cotton swabs charged with a bacterial or fungal suspension ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) were inoculated on Muller Hinton agar plates containing 5 wells (7.0 mm diameter cut in the agar gel). Each well was then filled with the following amounts of the endodontic paste and their individual components dissolved in 50µl of dimethyl sulfoxide (DMSO). Calcium hydroxide (8 mg dissolved in 50µl of DMSO) was also tested. In addition, two concentrated oil compounds were tested, tricresol formalin and camphorated paramochlorophenol. Tetracycline was considered as the positive control and DMSO as the negative control. The plates inoculated with aerobic bacteria were incubated at 35°C for 20 h under normal atmosphere. Those inoculated with anaerobic bacteria were incubated anaerobically using an Anaerobic Gas Pak System (Becton, Dickinson & Co Sparks, MD) at 35°C for 72hs. All materials induced growth inhibition zones. Zinc oxide and calcium hydroxide demonstrated a low level of antimicrobial activity. Zones of inhibition induced by tricresol formalin and camphorated paramonochlorophenol were similar to that shown by the endodontic paste.

Keywords: Antimicrobial activity, Endodontic paste, Microorganisms, Tetracycline

## 1 INTRODUCTION

The invasion of tooth pulp by bacteria or their bioproducts results in pulpal necrosis and infection, constituting a host defense reaction in the periapical root tissues which prevents pathogen dissemination beyond the root canal. Endodontic treatment is performed to control the infection, to allow healing of the periradicular tissues (HOELSCHER *et al.*, 2006; MANZUR *et al.*, 2007).

The success of this treatment is directly influenced by the elimination of the microorganisms from infected root canals. Viable microorganisms remaining after root canal preparation and disinfection contribute significantly to failure in endodontic therapy (ROSENTHAL *et al.*, 2004; MELKER *et al.*, 2006).

Studies have demonstrated that the root canal microbiota of teeth with failed endodontic treatment differs from that normally found in untreated teeth (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECLULIENE *et al.*, 2001).

The individual species of the endodontic microbiota are usually of low virulence, but collectively they are pathogenic due to a combination of factors that contribute to the maintenance of polymicrobial infections (Seltzer and Faber, 1994; Estrela *et al.*, 2000; Windley *et al.*, 2005) and they comprise anaerobic and facultative bacteria (SUNDQVIST, 1976; TRONSTAD *et al.*, 1987; BAUGARTNER *et al.*, 1991; SUNDE *et al.*, 2002; DESAI, *et al.*, 2004).

Different measures have been proposed to reduce the number of root canal microorganisms, including the use of various instrumentation techniques, irrigation regimens and intra-canal medication (ROSENTHAL *et al.*, 2004). Viable bacteria can be recovered from the root canals after being treated by an effective disinfection process (AMORIM L *et al.*, 2006).

For many years the systemic and topical use of antibiotics has been applied in dentistry. However, the systemic administration of an antibiotic, with a negligible concentration reaching the root canal, is unlikely to be beneficial. The main advantage of local, compared to systemic, antibiotic administration is that systemic consequences and complications are avoided and substantially higher concentrations can be utilized (GOODSON, 1989).

Particularly in pediatric dentistry, difficulties in antimicrobial control require the use of root canal filling pastes with a broad spectrum of antimicrobial activity (AMORIM *et al.*, 2006).

Cappiello (1964-1967) developed an antibiotic paste with zinc-oxide-eugenol (ZOE) and obtained better results in the immature tooth pulpotomies. In another case, Amorim *et al.* (2006), the antimicrobial efficacy of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry was compared by two experimental methods and it was found that all root canal filling materials induced the formation of inhibition zones, except for Vitapex.

Hoelscher *et al.* (2006) evaluated in vitro the antimicrobial effects of five antibiotics when added to Kerr Pulp Canal Sealer EWT. Five antibiotics: amoxicillin, penicillin, clindamycin, metronidazole and doxycycline were added separately to Kerr sealer. The results revealed that sealer-antibiotic combinations containing amoxicillin, penicillin, clindamycin, and doxycycline showed significant differences in the mean zones of inhibition when compared to Kerr EWT sealer alone.

The aim of this in vitro study was to evaluate the antimicrobial effects of endodontic paste prepared with tetracycline, thiamphenicol and zinc oxide used at the Londrina University Dental School.

## 2 MATERIALS AND METHOD

### 2.1 MEDICATIONS:

Tetracycline (bristol-myers squibb), thiamphenicol (zambon), zinc-oxide (biodinamic), calcium hydroxide pa (quimis mallinkrodt), tricresol formalin (inodon), camphorated paramonochlorophenol (ss white).

### 2.2 PREPARATION OF ENDODONTIC PASTE

The paste was prepared with 8 mg of tetracycline, 26.67 mg of thiamphenicol and 1.25 mg of zinc oxide. The components of endodontic paste were mixed to obtain a toothpaste consistence.

### 2.3 MICROORGANISMS AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY

This study was carried out with the following microorganisms: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Clostridium difficile* ATCC 9689, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 and one yeast *Candida albicans* ATCC 14053 (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

The aerobic indicators were incubated at 35°C for 20h. The cultures were then diluted with broth to give  $10^5$  -  $10^6$  CFU/ml. Mueller–Hinton agars and broth (Difco Laboratories) were used for the bacterial and fungal growth. Except for *F. nucleatum* and *C. difficile* which



were incubated under anaerobic conditions (35°C for 72h), all the cultures were incubated under aerobic conditions.

## 2.4 AGAR DIFFUSION METHOD

Cotton swabs charged with a bacterial or fungal suspension ( $10^5$ - $10^6$  UFC/ml) were inoculated on Muller Hinton agar plates containing 5 wells (7.0 mm diameter cut in the agar gel) (SMÂNIA et al, 1995). Each well was then filled with the following amounts of the endodontic paste and their individual components dissolved in 50µ of dimethyl sulfoxide (DMSO): 375 mg paste, 8 mg tetracycline, 26.6 mg thiamphenicol and 1.2 mg zinc-oxide. Calcium hydroxide (8 mg dissolved in 50µl of DMSO) was also tested. In addition, two concentrated oil compounds were tested, tricresol formalin and camphorated paramochlorophenol. Tetracycline was considered the positive control and DMSO the negative. The plates inoculated with aerobic bacteria were incubated at 35°C for 20 h under normal atmosphere. Those inoculated with anaerobic bacteria were incubated anaerobically using an Anaerobic Gas Pak System (Becton, Dickinson & Co Sparks, MD) at 35°C for 72 h. A positive result was defined as a zone of inhibited growth of the bacterial or fungal strain with a diameter of 9 mm or more.

## 3 RESULTS

The results of the agar diffusion test are shown in Table 1. All materials induced growth inhibition zones. Zinc oxide and calcium hydroxide demonstrated a low level of antimicrobial activity. Zones of inhibition induced by tricresol formalin and camphorated paramonochlorophenol were similar to that shown by the endodontic paste. The tricresol

formalin gave a larger zone of inhibition than camphorated paramonochlorophenol for the microorganisms tested.

Table 1: Diameters (in mm) of the inhibition zones in the agar diffusion test.

Subst \ Bac	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. difficile</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>S. epidermis</i>
Tetracycline	50	50	40	20	40	30	40
Zinc oxide	20	13	10	6	30	25	25
Thiamphenicol	40	40	50	26	50	40	40
<b>EP</b>	55	57	43	38	40	30	41
TCF	60	50	60	60	50	50	40
Ca(OH) <sub>2</sub>	16	28	10	18	13	15	13
PMCFC	40	35	40	42	40	30	44

**EP:** endodontic paste

Ca(OH)<sub>2</sub>: calcium hydroxide PA

TCF: tricresol formalin

PMCFC: camphorated paramonochlorophenol

## 4 DISCUSSION

Microorganisms are the most important etiological factors in endodontic infection. Bacterial invasion of the pulp results in pulpal necrosis and infection, constituting a host defense reaction in the periradicular tissues that prevents dissemination of pathogens beyond the root canal (MANZUR *et al.*, 2007).

In mature teeth, disinfection is carried out with a combination of instrumentation, irrigation and the placement of intracanal medication. However, complete disinfection can not

be achieved through mechanical instrumentation alone (WINDLEY *et al.*, 2005). The complete resolution of pulpal infection requires the application of root canal filling materials with antimicrobial properties (AMORIM L. *et al.*, 2006).

In this study, the agar diffusion test was used to assess antimicrobial activity of endodontic paste prepared with tetracycline, thiamphenicol and zinc-oxide against common endodontic pathogens. Similar medications were also tested. This method of testing has been used to determine the antibacterial properties of endodontic sealers (COBANKARA *et al.*, 2004). The results obtained in this study showed that all medications induced growth inhibition zones in the case of several pathogen species. The endodontic paste showed the strongest antimicrobial activity. Several Brazilian pediatric dentists use endodontic pastes, for example Guedes-Pinto paste, zinc oxide and eugenol paste, calcium hydroxide paste and Vitapex with good clinical results. The use of endodontic pastes with antibiotics is recommended for teeth with a complex anatomy of the root canal system that often makes complete debridement impossible. Even after thorough cleaning, shaping and irrigation with disinfectants, complete elimination of bacteria is difficult to achieve (BYSTRÖN AND SUNDQVIST, 1985).

Therefore, difficulties in antimicrobial control require the use of root canal filling pastes with a wide range of antimicrobial activity (AMORIM *et al.*, 2006).

Tetracycline, are a group of bacteriostatic antimicrobials with a broad spectrum of activity and effectiveness against spirochetes, and many anaerobic and facultative bacteria. They act through inhibition of protein synthesis on the surfaces of ribosomes. Khademi *et al.* (2006) demonstrated that the antimicrobial activity of 50 mg ml<sup>-1</sup> tetracycline HCl was significantly greater than chlorhexidine digluconate for 12 days. Gutta-percha containing tetracycline has been reported to inhibit the growth of *Actinomyces*, *Fusobacterium* and *E. fecalis* (MELKER *et al.*, 2006). Thiamphenicol is an antifungal drug with a broad spectrum

of activity against both gram-positive and gram-negative microorganisms, acting through inhibition of protein synthesis. In the present study both drugs inhibited the growth of all the microorganisms tested.

Calcium hydroxide and zinc-oxide demonstrated a low level of antimicrobial activity in the agar diffusion test. The antimicrobial properties of calcium hydroxide are attributed to a high pH and the ability to destroy the cytoplasm membrane, denaturalize bacterial enzymes and proteins, and damage bacterial DNA (SIQUEIRA AND LOPES, 1999). Nevertheless, when placed within the root canal it has limited efficacy in the elimination of root canal bacteria in vivo (SHUPING. *et al.* 2000, MCGURKIN-SMITH *et al.*, 2005). Moreover, other studies have reported an increase in the proportion of positive cultures and bacterial counts (KVIST *et al.*, 2004; WALTIMO *et al.*, 2005). Hume (1986) demonstrated that the antimicrobial effectiveness of ZOE is primarily a result of eugenol being a potent antibacterial agent, in contrast with our study in which only zinc-oxide was used.

Camphorated paramonochlorophenol is a phenolic-derived agent with bactericidal activity but also high toxicity (AMORIM *et al.*, 2004). It disrupts bacterial cytoplasmatic membranes, denatures proteins and inactivates enzymes. Furthermore, it liberates chlorine, a strong oxidizing agent that inactivates enzymes with sulfhydryl groups (SIQUEIRA *et al.*, 1996). The results here reported are in agreement with previous studies that employed the direct contact of camphorated paramonochlorophenol with microorganisms in agar diffusion test (STEVENS & GROSMANN, 1983; SIQUEIRA & UZEDA, 1996).

In this study, tricresol formalin demonstrated a high level of activity in the agar diffusion test for all endodontic pathogens tested, however, it is not currently used as a long-term intracanal medication. It is considered a potent bactericidal but with high toxicity toward periapical tissues. Moreover, Menezes and Valera *et al.* (2004) demonstrated that tricresol formalin was not effective against *C. albicans*.

Considering that the resolution of pulpal infection requires the complete elimination of endodontic pathogens and that several intracanal medications have high toxicity, the combination of antibiotics in endodontic pastes offers a possible alternative for treatment.

## **CONCLUSIONS**

In conclusion, the results obtained in this study demonstrate the effectiveness of this triple antibiotic endodontic paste and indicate its potential for use in the treatment of pulpal infection, particularly in pediatric dentistry.

## **REFERENCE LIST**

1. Amorim CVG, Aun CE, Mayer MPA. Susceptibility of some oral microorganisms to chlorhexidine and paramonochlorophenol. *Braz Oral Res* 2004; 18:242-246.
2. Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal fillings pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006; 17: 317-322.
3. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17:380-383.
4. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18:35-40.
5. Cappiello J. Pulp treatment in immature incisors. *Rev Circ Odontol* 1964; 52:138-145.
6. Cappiello J. Nuevos enfoques em odontologia infantil. *Rev. Circ. Odonto* Rosário, v.52, p.138-145, 1964.
7. Cobankara FK, Altinoz HC, Ergani O, Kav K, Belli S. In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 2004; 30:57-60.
8. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *Int Endod J* 2001; 34:341-345.

9. Goodson J. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. *J. Dent Res* 1989; 68:1625-1632.
10. Hoescher AA, Bahcall JK, Maki JS. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of a root canal-sealer-antibiotic combination against enterococcus faecalis. *J Endod* 2006; 32:145-147.
11. Hume WR. The pharmacology and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J Am Dent Assoc* 1986; 113:789-791.
12. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantives of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006; 32:112-115.
13. Kvist T, Molander A, Dahlén G, Reit C. Microbiological evaluation of one- and two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized, clinical trial. *J Endod* 2004; 30:572-576.
14. Manzur A, González AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial qualification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: A randomized clinical trial. *J Endod* 2007; 33:114-118.
15. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)<sub>2</sub>. *J Endod* 2005; 31:359–363.
16. Melker KB, Vertucci FJ, Rojas MF, Proquleske-Fox A, Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials. *J Endod* 2006; 32:148-151.
17. Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigates and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J* 2004; 37:311-319.
18. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of rootfilled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.
19. Pecluliene V, Reynauld AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34:429-434.
20. Rosenthal S, Spangberg I, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 2004; 98:488-492.
21. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78:634-645.
22. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000; 26:751-755.

23. Siqueira JF Jr and Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-369.
24. Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996, 22:674-676.
25. Smânia A, Monache FD, Smânia EF, Gil ML, Benchetrit LC, Cruz FS. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology* 1995, 45:177-181.
26. Stevens RH, Grossman LI. Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 1983; 9:372-374.
27. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28:304-310.
28. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps (Dissertation). Umea, Sweden: University of Umea, 1976. Apud Siqueira, JF. *Treatment of endodontic infections*. 1a. ed., Rio de Janeiro: Medsi Odontological Dissertations 1997.
29. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:86-93.
30. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3:86-90.
31. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year followup of periapical healing. *J Endod* 2005; 31:863-866.
32. Windley W 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005; 31:439-443.

## 2.3 VERSÃO EM PORTUGUÊS ARTIGO NÚMERO 2

### **COMPATIBILIDADE BIOLÓGICA DA PASTA ENDODÔNTICA COMPOSTA DE TETRACICLINA, TIANFENICOL E ÓXIDO DE ZINCO IMPLANTADA NO TECIDO SUBCUTÂNEO DE RATOS**

Elisabeth Cristina Gomes de Mattos<sup>1</sup>; Marcelo Carvalho Chain <sup>1</sup>; Adair Roberto Soares dos Santos<sup>2</sup>; Ricardo Tramonte<sup>3</sup>, Rubens Rodrigues Filho<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Estomatologia; <sup>2</sup>Departamento de Fisiologia e <sup>3</sup>Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil.

Autora para correspondência: Elisabeth Cristina Gomes de Mattos

Rua Artista Bittencourt, 160 apto.203-Centro– Florianópolis

CEP 88.020-060– SC – Brasil

Telefone: +55 (048)32242698

Endereço de e-mail: elisabethgm@hotmail.com

*Artigo formatado segundo as normas da revista International Journal of Odontoestomatology*



## RESUMO

Além da atividade antimicrobiana, pastas endodônticas com antibióticos devem ser biocompatíveis. O objetivo deste estudo foi avaliar a biocompatibilidade da pasta composta por óxido de zinco (1,25 mg), tetraciclina (8 mg) e tianfenicol (26,67 mg). A pasta e seus componentes foram implantados separadamente dentro de tubos de polietileno de 10 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro, estéreis, no tecido subcutâneo de ratos com controle do experimento em intervalos de 3, 7, 15 e 30 dias. Em cada dia 6 ratos foram utilizados, sendo 3 com implante das substâncias em quatro sítios localizados no dorso dos animais e 3 animais sham onde implantou-se os tubos de polietileno vazios para observar-se a possibilidade de contribuição destes tubos em reação inflamatória desencadeada no tecido subconjuntivo. Os animais experimentais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina e xilazina (0,75ml/gr de peso). Foi realizada a tricotomia da região dorsal dos animais. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados com overdose do mesmo anestésico. Realizou-se biópsia excisional da área do implante com até 10 mm de limite de segurança e incluídas em parafina seguindo um plano de cortes histológicos aleatórios e uniformemente isotrópicos, cortes denominados , ORIENTATOR dentro dos princípios da estereologia obtendo-se uma estimativa estatística da quantidade relativa de células inflamatórias ou não dentro do sistema teste, obtendo-se como resultado a biocompatibilidade da pasta sendo o óxido de zinco o elemento mais tóxico pela qualidade das células encontradas.

Palavras chaves: teste de materiais, tetraciclina, tianfenicol, óxido de zinco.

## INTRODUÇÃO

Embora o conceito de tratamento ético de pacientes venha desde o tempo de Hipócrates (460-377AC), a idéia de que novos materiais dentários devam ser testados com segurança e eficácia antes do uso clínico é muito mais recente, 30 a 40 anos de existência (ANUSAVICE, 2005). Estrela (2005), define biocompatibilidade como a capacidade de um material exercer funções específicas quando aplicado em contato com tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízos aos mesmos.

Para uma correta avaliação dos materiais odontológicos, organizações governamentais ou não como: Federation Dentaire Internationale, (FDI), International Standards Organization (ISO), e American Dental Association (ADA), padronizaram metodologias.

Para Estrela, (2005), antes de se inserir um material para substituir um tecido perdido, deve-se conhecer a estrutura e função deste tecido assim como as propriedades do material. Os testes a serem aplicados para cada tipo de material são selecionados de acordo com o local de aplicação e com os riscos envolvidos e podem ser divididos em três níveis: testes iniciais de toxicidade, testes secundários, relacionados à toxicidade tecidual local, teste de implantação subcutânea e testes de aplicação ou pré-clínicos.

Muitos estudos têm sido feitos em termos de avaliação da resposta tecidual aos materiais dentários. Takahashi et al., (2007), analisaram as respostas teciduais às pastas de Guedes Pinto e hidróxido de cálcio. Neste estudo com ratos, a pasta de Guedes Pinto causou menor edema e proporcionou menor inferência no processo de reparo.

Oliveira e Zamperini (2007), em uma avaliação biológica, em tecidos conjuntivos de ratos, de materiais odontológicos utilizados para proteção pulpar verificaram que todos os

materiais foram irritativos ao tecido conjuntivo nos períodos iniciais e o Hydical apresentou melhores resultados biológicos.

Quanto à associação de antibióticos a materiais dentários a importância iniciou na década de 60 com Capiello (1964), que estudou as possibilidades do tratamento endodôntico de dentes decíduos. Shay (1960), analisou o uso de antibióticos para conservação da vitalidade pulpar. Perdiza (1964), estudou a associação do óxido de zinco ao cloranfenicol como obturador endodôntico.

Sabe-se, portanto que bactérias remanescentes no sistema de canais radiculares são um fator significativo em falências endodônticas. (Melker et al., 2006), sendo os gêneros anaeróbios estritos *Fusobacterium*, *Prevotella*, e *Phorphiromas* as predominantes em infecções pulpares e periapicais (Tronstad et al., 1987; Baugartner et al., 1991; De Deus, 1992; Vigili et al. 1997; Sunde et al. 2004; Desai, et al., 2004). Em lesões endodônticas, além de bactérias anaeróbias também são encontradas espécies fúngicas (Bezerra da Silva et al., 2000). Os microrganismos citados anteriormente ao alcançarem áreas dentárias mais internas tornam-se inacessíveis ao preparo biomecânico, dificultando a ação do curativo de demora, permanecendo no sistema de canais radiculares depois do tratamento endodôntico. Windley e colaboradores (2005), testaram *in vivo* e *in vitro* uma pasta composta pelos antimicrobianos ciprofloxacina, metronidazol e minociclina e obtiveram a eliminação dos microrganismos patogênicos. Fidalgo et al., 2007 analisaram a ação antimicrobiana *in vitro* de 5 pastas utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos sendo que as pastas CTZ e 3 Mix com antibióticos, tiveram resultados melhores. Amorim et al., (2006), comparou três pastas odontopediátricas com antibióticos e concluiu que especialmente em odontologia pediátrica, dificuldades no controle antimicrobiano requerem o uso de pastas obturadoras de canais radiculares com larga atividade antimicrobiana.

Na década de 1960, Cappiello desenvolveu um cimento à base de antibióticos, óxido de zinco e eugenol e, desde então tem sido adotado na Universidade Estadual de Londrina para tratamento endodôntico de dentes decíduos com resultados bastante favoráveis. (Walter et al, 1965). Em 1994, Costa et al., estudaram a biocompatibilidade da pasta de Cappiello com eugenol na composição, tendo como controle a pasta de óxido de zinco e eugenol implantando as substâncias em tubos de polietileno de 10 mm em duas lojas no dorso de ratos da espécie Wistar. Em 2002, Ajimura et al., repetiram o estudo removendo-se o eugenol da fórmula inicial da pasta observando-se então grande toxicidade da pasta de endodontia com antibióticos quando comparada com o cimento de óxido de zinco e eugenol.

Ajimura et al., (2002), usou 30 ratos de ambos os sexos, linhagem Lewis, períodos experimentais de 3, 7, 15, 30, 60 dias, Souza et al., (2005), 32 ratos, machos, Wistar norvegicus, Costa et al., (1994), em estudo semelhante ao desta pesquisa, usou 25 ratos e períodos de controle de 3, 7, 15, 30 e 60 dias com biópsias. Têm sido recomendados que um período curto de avaliação (48 horas) é importante para determinar os efeitos da incisão e do procedimento operatório. Um período de sete dias para avaliar a evolução do quadro reacional, um período de 14 dias, 30 e 60 dias para determinar de maneira comparativa o padrão reacional para cada material em teste e sinaliza para o provável mecanismo de reparação em períodos mais longos.

Pela literatura consultada observa-se controvérsia a respeito dos efeitos provocados por esta pasta manipulada inicialmente por Cappiello, no tecido subcutâneo de ratos.

O objetivo desta pesquisa é avaliar a biocompatibilidade da pasta composta por óxido de zinco, tetraciclina e tianfenicol na substituição do eugenol como meio para a mistura, analisando-se separadamente seus componentes, para identificarmos a existência de algum componente tóxico já que a eficácia clínica desta pasta foi comprovada na UEL (Walter et al, 1965).

## **MATERIAIS E MÉTODO**

### **1 PADRONIZAÇÃO DA PASTA ENDODÔNTICA:**

Para ter uma padronização da quantidade da pasta a ser implantada nos animais estabeleceu-se que seria a quantidade colocada na câmara pulpar de dentes decíduos molares que corresponde a cerca de 0,365g. Para isso misturaram-se os componentes da pasta para obter a consistência preconizada pela UEL, empregando-se os seguintes materiais:

Medicamentos: Tetraciclina (Bristol-Myers Squibb), Tianfenicol (Zamboni), Óxido de Zinco (Biodinâmica).

A pasta foi preparada com 8 mg de tetraciclina, 26.67 mg de tianfenicol e 1.25mg de óxido de zinco. Os componentes da pasta endodôntica foram misturadas para obter uma consistência de pasta dental.

### **2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS:**

Utilizaram-se 24 ratas fêmeas Linhagem Wistar, com 200 a 300 gr. Divididas em 4 grupos experimentais com 6 animais em cada um dos grupos, sendo 3 operados e 3 shams para avaliarmos a possibilidade de reação inflamatória causada pelos tubos de polietileno ou apenas pelo ato cirúrgico. Cada grupo de animais foi analisado em períodos de 3, 7, 15 e 30 dias. O presente trabalho foi aprovado pela CEUA-UFSC-PP00095.

### 3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA IMPLANTAÇÃO DA PASTA ENDODÔNTICA

O procedimento operatório para implantar os materiais experimentais foi realizado em ambiente asséptico.

Fizeram-se quatro sítios de incisão no dorso dos animais. A pasta endodôntica, e os componentes em separado, foram implantados no dorso dos animais em tubos de polietileno estéreis de 10 mm de comprimento e 1,3 mm de diâmetro de acordo com a seqüência da fig. 1 em todos os animais.

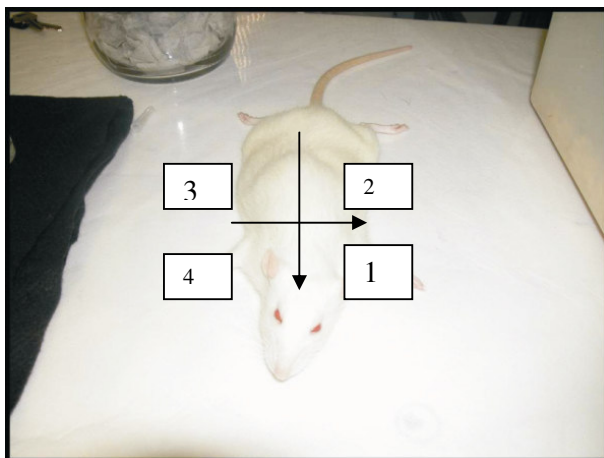


Figura 1- 1-pasta, 2-óxido de zinco, 3-tianfenicol, 4-tetraciclina.

Uma das extremidades dos tubos foi fechada a quente. Os materiais experimentais em pó, ou seja, a tetraciclina e o óxido de zinco foram dissolvidos em meio neutro, e o tianfenicol, retirado na forma de gel de dentro da cápsula, sendo então introduzidos nos tubos com a utilização de seringas de insulina estéreis, tomando-se cuidado para evitar extravasamento. Os materiais experimentais foram preparados imediatamente antes de introduzi-los no tubo.

Os animais experimentais foram anestesiados intraperitonealmente com ketamina e xilazina (0,75ml/gr de peso). Todo material cirúrgico foi autoclavado. Foi realizada a tricotomia da região dorsal do animal. A desinfecção da área da tricotomia foi realizada com álcool/iodado (95% de álcool a 70% em 5% de iodo). Fez-se uma incisão de 18 mm de comprimento em cada sítio, sendo o tecido subcutâneo do animal divulsionado lateralmente. A divulsão lateral atingiu uma profundidade de 8 mm. Com auxílio de uma pinça curva adaptada, os tubos preenchidos com os materiais em teste foram introduzidos nas lojas cirúrgicas. Os tubos de polietileno permaneceram paralelos à incisão, com sua abertura direcionada para a cabeça do animal. A sutura foi finalmente realizada com fio de algodão 3.0. Decorridos os períodos experimentais, os animais foram anestesiados com overdose do mesmo anestésico, e a biópsia excisional da área do implante foi realizada.

#### **4 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DO TECIDO SUBCUTÂNEO:**

A maneira de execução das biópsias dos tecidos conjuntivos onde foram feitos os implantes de pasta ou de seus componentes isolados é de fundamental importância para possibilitar a correta confecção das lâminas que possibilitaram alcançar o objetivo proposto. Discos de papel, com tamanho compatível ao da biópsia, foram utilizados para facilitar a fixação do tecido em solução de formol a 10% tamponado. Após 48 horas de fixação, as peças cirúrgicas foram seccionadas a partir da ponta aberta do tubo de polietileno implantado extendendo-se até 10 mm (limite de segurança) e depois incluídas em parafina seguindo um plano de corte (fig. 2), obtendo-se cortes histológicos aleatórios e uniformemente isotrópicos (URL), ou seja, cortes ORIENTATOR (Mattfeldt et al., 1986), dentro dos princípios da estereologia para obter-se uma estimativa estatística da quantidade relativa de células dentro

do sistema teste, já que analisamos desta forma as células em todo o volume do corte histológico.

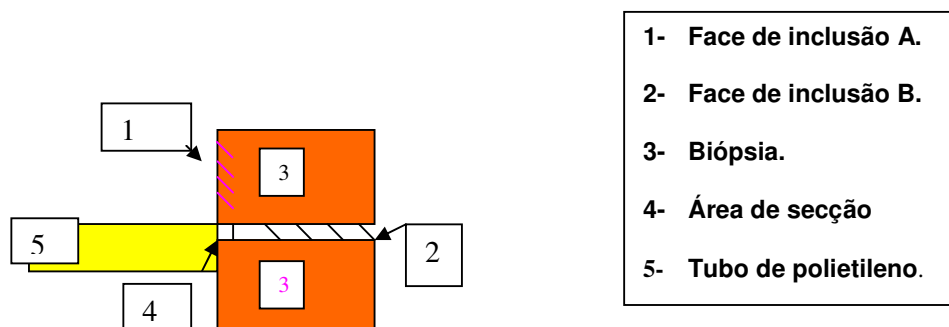


Figura 2 - Esquema do tipo de corte realizado na pele do rato indicando a face de inclusão em parafina para confecção das lâminas de histologia utilizadas para quantificar as reações teciduais provocadas pela pasta endodôntica implantada nos animais.

Tal metodologia permite o cálculo da área e do volume do tecido conjuntivo em contado com a pasta endodôntica e com cada um dos seus componentes.

As 2 peças assim obtidas foram incluídas em parafina e submetidas à microtomia. Obtiveram-se em média 5 cortes de 5µm de espessura semi seriados (espaçamento 500/500 mm) de cada uma das 2 peças. Os cortes semi seriados foram feitos até que desapareçam todos os vestígios das possíveis reações teciduais provocados pelo material contido no tubo. Obtiveram-se 83 lâminas com um total de 415 cortes histológicos.

Os cortes histológicos foram corados pelo H.E e analisados em Microscópio óptico Nikkon Labphot II, dotado de uma grade ocular, previamente calibrada com uma “lâmina objeto” para indicar o Coeficiente Micrométrico de cada uma das objetivas utilizadas para mensuração da reação inflamatória e número de células presentes em áreas específicas no tecido conjuntivo subcutâneo destes animais, segundo o método preconizado por Mandarin-de-Lacerda 2003, para análises estereológicas.

Para realizar a análise morfométrica e cálculo da área de análise da reação inflamatória foi utilizado um Sistema-Teste (Briarty, 1975), quadrado composto por linhas,



previamente calibrado com lâmina-objeto, com objetiva de 4x com área total de 3,2mm X 1,8mm. .

Para cálculo do número de polimorfonucleares e mononucleares presentes no tecido conjuntivo situado em frente ao tubo de polipropileno, utilizamos o mesmo Sistema-Teste previamente calibrado com objetiva de 100x, cuja área total corresponde a 130 micrometros de comprimento por 92 micrometros de largura. Para isto foram analisadas 5 áreas aleatórias situadas dentro do tecido conjuntivo que apresentava ou não reação inflamatória a pasta ou aos seus componentes (Almeida e Souza ,2003).

Os seguintes eventos histológicos foram avaliados dentro destas áreas: necrose, reação inflamatória, amplitude da área reacional junto à abertura do tubo (espessura da cápsula), presença de macrófagos e células gigantes e quantidade de polimorfonucleares e mononucleares.

## RESULTADOS:

Tabela 1: Contagem de células dentro da “área-teste” analisada com o total do número das células mononucleares e polimorfonucleares encontrados por substância no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos nas 5 áreas das lâminas em cada um dos dias do experimento.

Dias/células Meio	3 M	3P	7M	7P	15M	15P	30M	30P
TTZ	4	6	6	0	2	0	0	0
OZE	6	4	5	3	32	10	64	11
GLI	1	0	0	0	4	0	3	0
TET	9	2	7	0	17	1	5	0
SHAN	0	0	0	0	0	0	0	0

**M-Mononucleares P-Polimorfonucleares TTZ: PASTA em pesquisa; OZE: Óxido de zinco; GLI: Tianfenicol; TET: Tetraciclina .SHAN animais controle**

Tabela 2 - Tamanho em mm da reação inflamatória provocada no tecido conjuntivo subcutâneo na pele de ratos, após a introdução do tubo de polietileno contendo a pasta endodôntica e seus componentes ao longo das peças. Média em 5 áreas de contagem.

Dias \ Subs.	3	7	15	30
TTZ	1.12mm	2.52mm	3.3mm	0 mm
OZE	1.34mm	2.14mm	5.24mm	5.96mm
GLI	1.86mm	0 mm	0.46mm	0, 2 mm
TET	4.18mm	5.32mm	1.46mm	2.44mm

TTZ: PASTA em pesquisa; OZE: Óxido de zinco; GLI: Tianfenicol; TET: Tetraciclina

## RESULTADOS

O óxido de zinco na primeira semana não apresentou reação inflamatória importante e restrita em uma área de 1,34mm de comprimento aos três dias e de 2.14 mm aos 7 dias a partir do implante do tubo no tecido conjuntivo dos ratos. Com quinze dias observou-se um aumento do número de mononucleares e alguns polimorfonucleares denunciando aumento da reação inflamatória em uma área de 5.24mm de comprimento. Aos trinta dias observamos uma grande quantidade de mononucleares e polimorfonucleares expressando uma reação inflamatória em torno de 5,96 mm de comprimento a partir da abertura do tubo de polietileno. (fig.2)

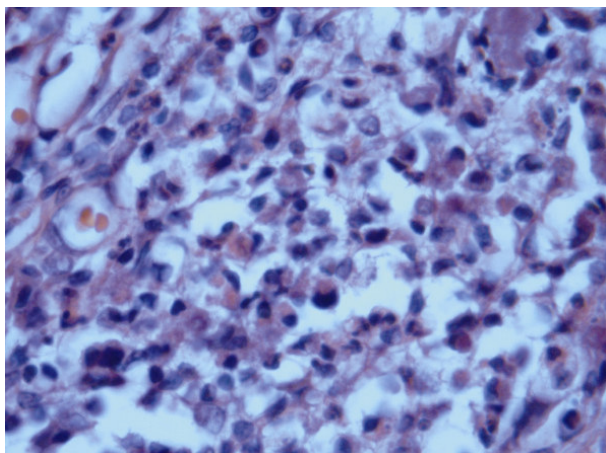


Figura 2 - Presença de polimorforfonucleares no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos após o implante de óxido de zinco aos trinta dias. (Obj. de 100X. coloração H.E.).

A tetraciclina com três dias mostra uma reação inflamatória com predominância de mononucleares nos primeiros cortes retirados junto ao tubo de polipropileno dentro de uma extensão de tecido inflamatório subcutâneo de 4,18mm em média dentro de 5 áreas de contagem de células com objetiva de 100x ,com uma área total de 100 micrometros quadrados, de observação, em cada área a partir do tubo de polietileno. Aos sete dias a reação fica menor em termos qualitativos de células, mas em uma área de 5,32mm em media ao longo das peças. A reação continua, porém cronificada em todos os dias do experimento com a tetraciclina, dentro de 2 mm ao longo das peças mostrando muitos mononucleares aos 15 dias (Fig.3).

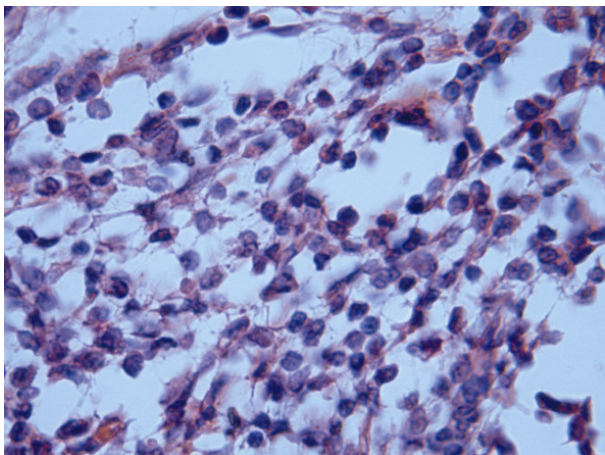


Figura 3 - Presença de grande quantidade de mononucleares no tecido conjuntivo subcutâneo de ratos após 15 dias de implantação do tubo com a tetraciclina.( Obj.100X. Coloração H.E.)

O tianfenicol não provoca praticamente nenhuma reação inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo dos ratos na primeira semana. A partir de quinze dias apresenta reação discreta em torno de 0,46mm ao longo das peças, com presença de poucos mononucleares o que se repete aos 30 dias de controle, indicando uma reação de caráter mais imunitário que fagocitário caracterizando uma reação cronificada.

A pasta provocou uma reação inflamatória com polimorfonucleares aos três dias, porém encapsulada, e limitada aos primeiros cortes junto ao tubo implantado em uma área de em média 1,12 mm. Aos 7 dias ela provoca uma reação no tecido conjuntivo com 2,52mm em média, nas cinco áreas examinadas, de comprimento, na qual observamos apenas mononucleares dentro das 5 áreas-testes analisadas. A reação aos 15 dias é muito pequena qualitativamente em média de 3,3mm a partir do tubo e cronificada. Aos trinta dias não há mais reação inflamatória neste tecido quando em contato com a pasta em pesquisa. Fig.4.

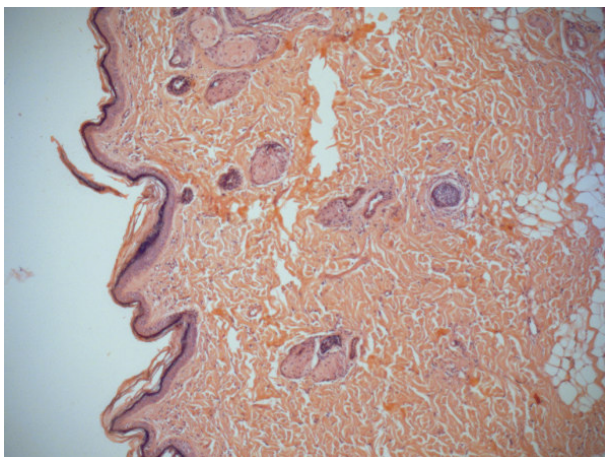


Figura 4 – Fotomicrografia da pele de rato mostrando a ausência de reação inflamatória do tecido conjuntivo subcutâneo ao implante da pasta aos 30 dias indicando a presença de muitos fibroblastos. (Obj. 10X. Coloração H.E.)

Junqueira e Carneiro, 2003 descrevem os fibroblastos como células envolvidas na cicatrização quando aparecem em maior quantidade. Observamos na fig.5 referente ao implante da tetraciclina em quinze dias, uma notável diferença do tecido conjuntivo no local correspondente ao implante do tubo com o medicamento. Comparando-se com o tecido conjuntivo de um animal sham (fig.6), com implante somente do tubo de polietileno estéril, observamos normalidade do tecido conjuntivo com poucas células resumidas em fibroblastos e substâncias intercelulares. Os resultados mostram nesta pesquisa que em todos os dias analisados que os tubos não agridem o tecido conjuntivo dos animais.

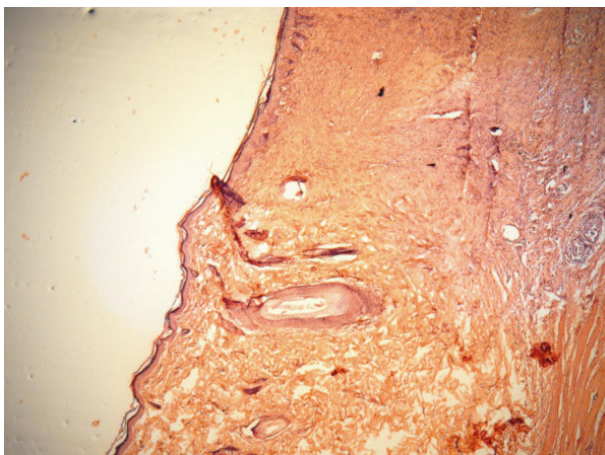


Figura 5 - Fotomicrografia da pele de rato mostrando a reação provocada no tecido conjuntivo subcutâneo ao implante do tubo com tetraciclina (15 dias) mostrando um grande aumento de fibroblastos. (Obj. 10X. Coloração H.E)

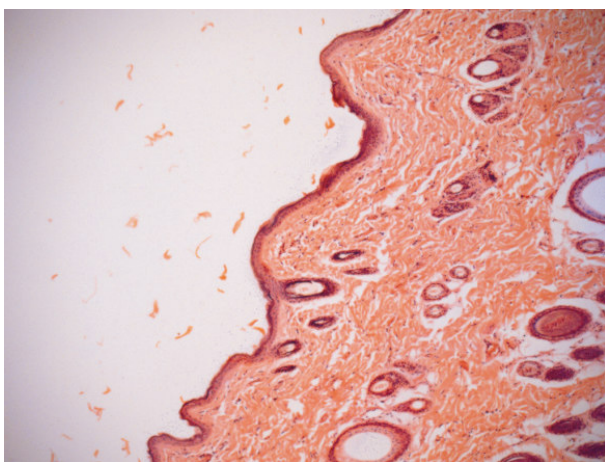


Fig.6- Fotomicrografia da pele de rato com o tecido conjuntivo normal nos animais do grupo Sham (15 dias). Notar que não houve nenhuma alteração morfológica tecidual visível. (Obj.10X.Coloração H.E.).

## DISCUSSÃO

A definição de biocompatibilidade nos diz que um material para ser biocompatível deve exercer funções específicas quando em contato com tecidos vivos de um hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízos ao mesmo (Estrela, 2005).

No presente estudo, analisamos a possibilidade da pasta endodôntica constituída por tetraciclina, tianfenicol e óxido de zinco ser biocompatível. Assim, a pasta e seus constituintes foram implantados no tecido subcutâneo de ratos, e o aparecimento ou não de reação tecidual foi avaliado 3, 7, 15 e 30 dias após a implantação. Os resultados obtidos indicam que a pasta em estudo induz reação inflamatória de baixa intensidade, principalmente quinze dias após a sua implantação e nenhuma reação trinta dias depois, o que sugere ser a pasta biocompatível com tecidos vivos.

No tecido conjuntivo podemos visualizar diferentes tipos celulares como plasmócitos, linfócitos, monócitos e macrófagos (células mononucleares) entrando no processo de defesa e reparo do organismo e que aparecem nos processos de inflamação crônica. Por outro lado, na inflamação aguda o predomínio é de células polimorfonucleares como linfócitos e eosinófilos (Junqueira e Carneiro 2003). Entretanto, Guidugli (1997) demonstrou que afirmar serem os polimorfonucleares típicos de inflamações agudas e os mononucleares de inflamação crônica é muitas vezes acadêmico, pois em algumas situações como nas osteomielites supurativas (crônica) têm predominância de neutrófilos e nas infecções virais (agudas), presença de mononucleares (Junqueira e Carneiro 2003). O presente estudo, não teve com objetivo identificar os tipos celulares, mas sim a sua presença caracterizando o tipo de inflamação.

O óxido de zinco quando aplicado isoladamente demonstrou ser o componente mais tóxico da pasta, principalmente 15 e 30 dias após a sua implantação, o que pode ser confirmado pela extensão da reação inflamatória e pelos tipos celulares presentes em maior quantidade (polimorfonucleares). Nossos resultados confirmam e estendem outros resultados como aqueles obtidos por Koulaouzidou, et al., (2005) que demonstraram ser o óxido de zinco mais citotóxico. Este potencial irritativo pode ser causado pela ausência de eugenol na composição da pasta, pois Costa et al., (1994) demonstraram que a pasta de óxido de zinco e

eugenol induziu uma reação inflamatória com predominância de mononucleares trinta dias após a sua implantação. Kielbassa et al., (2007) demonstraram que a pasta composta por óxido de zinco e eugenol induziram a formação de uma cápsula fibrosa que previne a reabsorção. Além disso, outros trabalhos tem demonstrado o efeito terapêutico do eugenol no conjuntivo da polpa dental (Watts and Paterson, 1987; Sübay et al., 1990).

O tianfenicol é um antifúngico de amplo espectro, derivado do cloranfenicol, que age sobre microorganismos gram-positivos e gram-negativos, atuando através da inibição da síntese protéica bacteriana (Shibli et al., 1995). Quando avaliado isoladamente o tianfenicol induziu uma reação inflamatória discreta no tecido conjuntivo, somente a partir da segunda semana e que se estendeu até 30 dias após a sua implantação, porém cronificada, demonstrando ser o tianfenicol um medicamento com pequeno potencial irritativo sobre o tecido conjuntivo.

Outro constituinte importante da pasta endodôntica em pesquisa é a tetraciclina, que se liga em graus variados às proteínas plasmáticas, formando complexos com o cálcio. Assim, a tetraciclina é depositada junto com o cálcio durante a calcificação do osso, da dentina e do cimento. A sua utilização na constituição da pasta se deve ao fato de ser ativa contra microorganismos gram-positivos e gram-negativos, bactérias anaeróbicas, anaeróbicas facultativas e espiroquetas, que fazem parte das infecções pulpares e periapicais (Windley et al., 2005). Além disso, a tetraciclina influencia a regeneração tecidual óssea, incluindo o efeito quimiotático para osteoblastos e atividade que contribui significativamente para a formação de novo osso, Chung et al., (1997), demonstrando que a tetraciclina possui compatibilidade biológica. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que este antimicrobiano foi capaz de induzir reação inflamatória no tecido conjuntivo dos ratos que teve sua maior intensidade 15 dias após a implantação, porém, com predomínio de mononucleares sugerindo ser um processo inflamatório crônico.



Todos estes componentes quando associados deram origem a uma pasta que foi capaz de induzir, 3 e 7 dias após a sua implantação, uma reação inflamatória aguda, porém, restrita (1,12 mm em média), com predomínio de mononucleares. Posteriormente houve uma regressão qualitativa de células e aos trinta dias não se observou mais reação inflamatória.

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, podemos inferir a hipótese de que a reação inflamatória causada pela pasta composta por tianfenicol, tetraciclina e óxido de zinco é muito pequena podendo caracterizar biocompatibilidade da mesma ao tecido conjuntivo. Trabalhando com materiais para forramento de cavidades, Oliveira et al., (1997), concluíram que os materiais são biologicamente aceitáveis, quando em contato com o tecido conjuntivo subcutâneo de ratos, ocorre reparação na área durante os períodos de experimento. Quando a reação é considerada pequena pode-se dizer que o material utilizado é biocompatível. Costa et al., (1996) concluíram que o óxido de zinco e eugenol apresentam biocompatibilidade aceitável pois foi observada uma reação com área de 0,347 mm sessenta dias após a sua utilização. Além disso, Minarelli e Roslindo (2003), concluíram a partir de experimentos realizados com prime bond que o mesmo é biocompatível após observarem a regressão dos eventos histológicos.

A partir dos resultados obtidos, há necessidade de dar prosseguimento aos testes de biocompatibilidade da referida pasta, agora aplicando-se o material em teste sobre os dentes de animais que possuam essas estruturas semelhantes às do homem.

## CONCLUSÃO

A pasta composta por tianfenicol, tetraciclina e óxido de zinco pode ser considerada biocompatível devido a limitação da área inflamatória e qualidade das células encontradas

sendo o óxido de zinco isoladamente o elemento mais irritante da sua composição devido a presença de polimorfonucleares ainda aos 30 dias.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Ajimura K T., Ferelle A., Akatsu T, Estudo comparativo da biocompatibilidade de um cimento à base de antibiótico contendo tianfenicol, tetraciclina e óxido de zinco com cimento de óxido de zinco e eugenol, em tecido subcutâneo de rato, XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR, 4/10/2002.

Almeida R. J. Souza C.J.A.S., “Biocompatibilidade de Materiais endodônticos em Odontopediatria: Avaliação histológica da resposta inflamatória, por meio de implantes intra-ósseo em cobaias guinea-pig”. Mestrado em ENDODONTIA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. 22p, 2003.

Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal fillings pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. Braz Dent J 2006; 17: 317-322.

Anusavice, K.J.; Materiais Dentários Philips, Elsevier, p.162-189. 11ª Ed. 2005.

Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod 1991; 17:380-383.

Barja-Fidalgo F.Hirata-Junior R., Oliveira B.H., Avaliação da ação antimicrobiana in vitro de 5 pastas utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos, Brazilian Oral Research. Vol.21, sep. p311, 2007.

Briarty L.G., Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy, Sci.Prog., Oxford, 1-32,1975.

Cappiello J. Nuevos enfoques em odontologia infantil. Rev. Circ. Odonto Rosário, v.52, p.138-145, 1964.

Chung M C., Ferreira E I., Química Nova, O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos, 1997, 75-85.

Costa C.A.S. Benatti Neto C. Abdalla R. E., Gonzaga H. F. S., Lia R. C. C., Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecido subcutâneo de rato. Rev. Odont. Univ. São Paulo, v 8, n 1, p 65-70, 1994.

Costa, C.A.S. Hebling I.; Teixeira, M.F. Compatibilidade biológica do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de cimento de óxido de zinco e Eugenol (OZE), variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do Eugenol. Rev. Odontol. Unesp v.25, n.1, p.135-44, 1996.

De Deus, Endodontia, Medsi, pag. 208-211, 2002.

Desai, M Gulabivala K., Ng Y.L. & Spratt D., Co-aggregation studies on bacteria from infected root canals, International Endodontics Journal, v37, 345-347, 2004.

Estrela, C. Metodologia Científica, Artes Médicas, p.231-273, 2005.

Guidugli N.. Elementos de Patologia Geral. São Paulo: Santos, 1997.

Junqueira L & Carneiro J. Histologia Básica, Guanabara Koogan, p.92-120, 2003.

Kielbassa, A.M., Uchtmann H., Wrbas T., Bitter K., et al, In vitro study assessing apical leakage of sealer-only backfills in root canals of primary teeth. Journal of Dentistry, v 35, issue 7, July, 2007.

Koulaouzidou, E.A., Konstatinos T. P., Economides N.A., Panagiotis B., Kortisaris A. H. Antiproliferative Effect of Mineral Trioxide Aggregate, Zinc Oxide-Eugenol Cement, and

Glass Ionomer cement Against Three Fibroblastic Cell Lines, *Journal of Endodontics*, vol.31, n 1 jan., p44-46., 2005.

Mandarin de Lacerda C.A. Stereological tools in biomedical research, *Na. Acad. Bras. Cienc.* 469-86, 2003.

Mattfeldt T, Krämer K L , Zeitz R and Mall G Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise *Virchows Archiv*, 473-484 1986 .

Melker, K. B., Vertucci F. J., Rojas M. F. Progulsk-Fox A., Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials, *Journal of endodontics*, vol 32, n 2, p 148-151, 2006.

Minarelli G. A.M.; Roslindo B., E. Histologic analysis of the effects of an dentin adhesive prime bond 2.0 in pulp of rats., *Rev. Odontol. UNESP* v. 32, n. 2, p. 105-111, jul./dez. 2003.

Oliveira M. R. B., Boldrini, S. C. Comelli R. C. Lia C. B. Neto, Compatibilidade Biológica de Materiais Odontológicos Fotopolimerizáveis e Ativados Quimicamente, Utilizados no Forramento de Cavidades (Baseline e Baseline Vlc), *Rev. Odontol. UNESP, São Paulo*, 26(2): 255-264 1997

Oliveira MRB & Zamperini CA, Avaliação biológica em tecidos conjuntivos de ratos de materiais odontológicos utilizados para proteção pulpar. *Brasilian Oral Research*. Vol.21, sep, p316. . 2007.

Perdiza, Walter, *Bol. Da F.F. O. Rib. Preto*, vol.II n 2 Tratamento conservador da polpa, p. 137-140 1964.

Shay, D.E. Uso de antibióticos para conservação da vitalidade pulpar, *J. Den. Children*, p.27-35, 1960.

Silva L.A. B.da, Perassi F.T., Iro I.Y., Yamashita J.C., Bonifácio K. C., Tanomaru Filho M. A presença de fungos nas infecções endodônticas, *UNIMEP*, v12, n 1 e 2 jan./dez, 2000.

Souza S. M. G., Bramante C. M., Taga E. M., Biocompatibility of EDTA, EGTA and Citric Acid, *Braz Dent Journal*, n 16, p 3-8, 2005.

Sunde, Pia Titterud, Olsen Ingar, Debelian Gilberto, Tronstad Leif, Microbiota of Periapical Lesions Refractory to endodôntico therapy, Journal of endodontics, vol.28, n4, p304-310, 2002.

Takahashi, K., Dezan-Junior E., Cunha RF, Avaliação da Resposta Tecidual às pastas Guedes Pinto e de Hidróxido de Cálcio, Análise Edemogênica e ao Microscópio óptico em ratos, Brazilian Oral Research. Vol.21, sep. P 310. 2007.

Tronstad, L.Barnett F.,Cervone F., Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodôntico treatment, Endodontic e Dental Traumatology, v 6, pag. 73-77, 1990.

Walther, L. F. Odontologia e comunidade, p 6-11, 1965.

Watts A. and Paterson R.C., Pulpal response to zinc oxide-eugenol cement, International Endodontic Journal ,V. 20 Issue 2 Page 82-86 March 1987.

Windley, W., Teixeira F., Levin L., Sigurdsson A., Trope M., Disinfection of I mmature Teeth with a Triple Antibiotic Paste, JOE, vol 31 n 6 Jun 2005.

Vigil, G.V.Wayman B.E., Dazey S.E., Fowler C.B., Bradley Jr. D.V., Indentification and antibiotic sensitive of bacteria isolated from periapical lesion, Journal of Endodontics, 23(2):110-114, feb.1997.

Shibli A. M. Pechere C,\*M. Ramadan A. "College of Pharmacy, King Saud University, P.O. Box: 2457, Riyadh 11451, Saudi Arabia 'Department of Genetics and Microbiology, Centre Medical Unwersitaire,1211 Geneva 4, Switzerland, Postantibiotic effect and host-bacteria interactions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1995) 36, 885-890

Sübay R.K., Cox C. F., Kaya H., Tarim B., Sübay A.A., Nayr M., , Human pulp reaction to dentine bonded amalgam restorations: a histologic study. Journal of Dentistry, Volume 28, Issue 5, Pages 327-332,1990.

## 2.4 VERSÃO EM INGLÊS ARTIGO NÚMERO 2

### **BIOLOGICAL COMPATIBILITY OF THE ENDODONTIC PASTE PREPARED WITH TETRACYCLINE, THIAMPHENICOL AND ZINC OXIDE IMPLANTED ON THE SUBCUTANEOUS TISSUE OF RATS.**

Elisabeth Cristina Gomes de Mattos<sup>1</sup>; Marcelo Carvalho Chain<sup>1</sup>; Adair Roberto Soares dos Santos<sup>2</sup>; Ricardo Tramonte<sup>3</sup>; Rubens Rodrigues Filho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Stomatology; <sup>2</sup>Department of Physiology and <sup>3</sup>Department of Morphological Sciences, University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

\*Corresponding author: Elisabeth Cristina Gomes de Mattos

Rua Artista Bittencourt n 160 apto 203, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil.

Zip Code: 88020060

Telephone: +55 (048) 32242698

Electronic mail: elisabethgm@hotmail.com

*Artigo formatado segundo as normas do International Journal of Odontoestomatology*

## ABSTRACT

An important requirement for endodontic paste with antibiotics placed in direct contact with living tissues is biocompatibility. The aim of this study was to evaluate the paste biocompatibility prepared with zinc oxide (1.25mg), tetracycline (8mg) and thiamphenicol (26.67mg). The paste and its components were implanted separately through polyethylene sterile tubes of 10mm in length and 1.3mm in diameter, in the subcutaneous tissue of rats with the experiment control at intervals of 3, 7, 15 and 30 days. Each day 6 rats were used, being 3 of them with implant of the substances in four sites placed on the back of the animals and 3 sham animals where it was implanted the polyethylene empty tubes. The experimental animals were anesthetized in an intra-peritoneal way with ketamina and xilazina (0.75ml / g body weight). After the experimental periods, the animals were anesthetized with the same anesthetic overdose. It was held an excision biopsy of the implant area with 10 mm to the security limit included in paraffin following a plan of random histological cut and uniformly isotropic or ORIENTED cuts according to stereological principles, getting a statistical estimative of the relative amount of inflammatory cells or not on the test system, getting as a result the paste biocompatibility, being the zinc oxide the most toxic element for the cell quality found.

Key words: Materials test; tetracycline;.zinc oxide; thiamphenicol

## INTRODUCTION

Although, the ethical treatment concept of patients comes since Hippocrates' age, the idea that new dental material must be tested safely and efficiently before clinical use it is much more recent (Anusavice, 2005). The biocompatibility is defined as the ability of a material exerting specific functions when applied in contact with living tissue of a particular host, without, however, causing damage or harm to them (Estrela, 2005).

Thus, before inserting a material to replace a lost tissue, it is needed to know the structure and function of this tissue as well as the material properties (Estrela, 2005). Many studies have been held to assess the tissue response to the dental materials. Takahashi et al (2007), analyzed the rat tissue responses of Guedes Pinto's paste and calcium hydroxide. Guedes Pinto's paste caused small swelling and provided less influence on the repairing process. Oliveira and Zamperini (2007), in a biological assessment in connective tissues of rats, the dental materials used for pulpal protection verified that all materials were irritating to the connective tissue in the early periods and Hydical presented better biological results.

The antibiotics combination to dental materials has began in 1960 when Shay analyzed the use of antibiotics for pulpal vitality conservation. Moreover, Perdiza in 1964 evaluated the zinc oxide combination to cloramphenicol as filling pastes of root canals and Cappiello (1964), evaluated different possibilities of achieving the endodontic treatment in immature teeth, including the use of a paste based on antibiotics.

It is known that remaining bacteria in the root canals system are a significant factor in the endodontic therapy failure (Melker et al., 2006), being the anaerobic gender strict to *Fusobacterium*, *Prevotella*, and *Phorphiromas* which are prevailing in pulpal and periapical infections (Tronstad et al. 1990; Baugartner et al., 1991; VigilI et al. 1997; De Deus, 2002; Sunde et al. 2002; Desai, et al., 2004). Besides, the anaerobic bacteria can be also found



fungal species on the endodontic injury (Silva et al., 2000). These microorganisms when they reach more internal dental areas become inaccessible to the biomechanical preparation, remaining in this way on the root canals system after the endodontic treatment. Windley et al (2005) have recently tested in vivo and in vitro a paste composed by antimicrobial ciprofloxacin, metronidazole and minocycline and obtained the pathogenic microorganisms removal commonly present in infected root canals. In addition, Borja-Fidalgo et al., (2007) analyzed the antimicrobial action in vitro of 5 pastes used in the endodontic treatment of immature teeth, being the pastes CTZ and 3 Mix composed of antibiotics which had better results.

Amorim et al., (2006) compared three pediatric pastes with antibiotics in its composition and concluded that especially in pediatric dentistry, the difficulties found in the antimicrobial control requires the use of filling pastes of root canals with broad antimicrobial activity. On the 1960's, Cappiello developed a cement based on antibiotics, zinc oxide and Eugenol, and since then it has being adopted at Londrina State University for immature teeth pulpotomis treatment with very favorable results (Walther, 1965). In 1994, Costa et al studied the paste biocompatibility of Cappiello that contains Eugenol in its composition, having as control the zinc oxide paste and Eugenol implanting the substances that were contained in polyethylene tubes of 10 mm in two shops on the back of the rats. Ajimura et al., (2002) repeated the study removing the Eugenol from the paste original formula and observed high toxicity of the endodontic paste with antibiotics when compared with zinc oxide and Eugenol cement.

The paste biocompatibility evaluation used on the researches by Ajimura et al., (2002) and Souza et al. (2005) was performed 3, 7, 15, 30, 60 days after the paste implantation. It is being recommended that in a short term of evaluation (two days) it is important to determine the incision effects and the surgical procedure. For a period of seven

days it was evaluated the rationale table evolution, and for 14, 30 and 60 days it was determined the comparative way of the rationale pattern for each material in test that signalizes likely the repairing mechanism for longer periods of time.

As among many papers published about the use of endodontic paste, containing antibiotics in its composition it is observed much controversy, the goal of this research was to evaluate the paste biocompatibility composed of zinc oxide, tetracycline and thiamphenicol, analyzing also separately their components to identify the existence of some toxic component since the paste clinical efficiency was proven at Londrina State University.

## **MATERIALS AND METHOD**

### **1 ENDODONTIC PASTE STANDARDIZATION**

For the paste amount standardization to be implanted in animals it was set that it would be the amount placed in the chamber of immature molar pulpal teeth which correspond to 0.365g. The paste was prepared with 8mg of tetracycline (Bristol-Myers Squibb), 26.67mg of thiamphenicol (Zamboni) and 1.25mg of zinc oxide (Biodinâmico) that were mixed to obtain a dental pulp consistency.

### **2 ANIMALS**

It was used 24 Wistar rats, with 200 to 300 gr divided into 4 experimental groups with 6 animals in each of them, being 3 operated and 3 sham. Each group of animals was analyzed for 3, 7, 15 and 30 days. This present work was approved by the CEUA - UFSC (number PP00095).

### 3 SURGICAL PROCEDURE FOR ENDODONTIC PASTE IMPLANTATION AND ITS COMPONENTS

Every surgical procedure was held using aseptic technique, under deep anesthesia, induced by i.p. injection of ketamina and xilazina (0.75 ml/g body weight). In a determined place was held an incision of 18 mm long and 8 mm in depth. The experimental materials in the form of powder, (tetracycline and zinc oxide) were dissolved in a neutral environment, and thiamphenicol (gel) was placed in tubes with the use of insulin sterile syringes. To avoid spreading one of the tube ends it has been closed to heat. With forceps aid, the polyethylene tubes containing the endodontic paste, and its components separately were implanted on the back of the animals according to the sequence represented in Figure 1. In sham animals only the tubes were implanted. Each polyethylene tube, 10 mm long and 1.3mm in diameter, was placed in parallel to the incision with the opening directed to the head of the animal. Afterwards, the tissue was repositioned and sutured skin with suture wire of 3.0. After the experimental periods, the animals were sacrificed with overdose of the same anesthetic, and excision biopsy of the area of the implanted tubes was held.

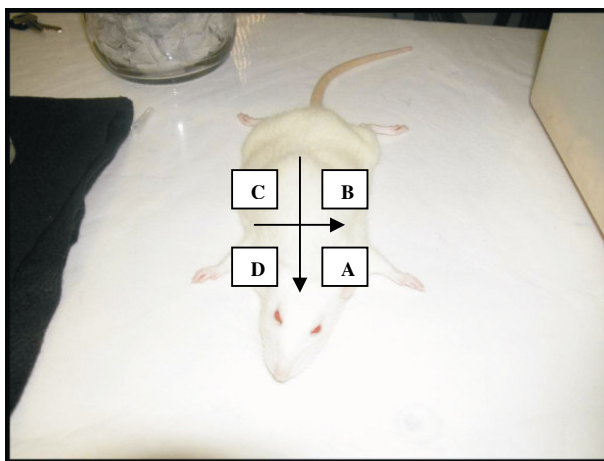


Fig. 1: Schematic representation of the surgical sites where the polyethylene tubes were implanted containing , paste (A), zinc oxide (B), thiamphenicol (C), tetracycline (D).

#### 4 HISTOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL ANALYSIS OF THE SUBCUTANEOUS TISSUE

Paper discs, compatible with the biopsy size were used to facilitate the tissue fixation in formaldehyde solution to 10% buffered. After 48 hours of fixation, the surgical pieces were sectioned from the tube opening tip of the polyethylene implanted, extending up to 10mm (security limit) and then included in paraffin following a cutting plan (Fig. 2), obtaining – random histological cuts and uniformly isotropic (URL), or rather, ORIENTED cuts (Mattfeldt et al, 1986), according to the stereological principles to obtain a statistical estimative of the relative amount of cells in the test system, since it was analyzed in this way the cells in the whole histological volume cuts.

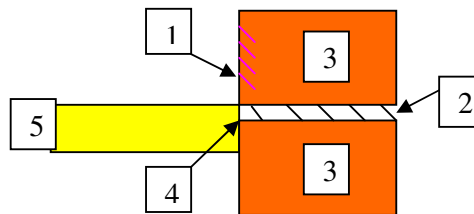


Fig. 2: The cutting schematic representation realized in the rat skin indicating the inclusion face in paraffin for manufacturing the blades used for quantifying the tissue reactions caused by endodontic paste or its components implanted in animals; (1) inclusion face A, (2) inclusion face B, (3) biopsy, (4) chamber area, (5) polyethylene tube.

This methodology allows the area calculation and the connective tissue volume to be in contact with the endodontic paste or with each of its components. In this present study it is analyzed the connective tissue reaction area measured in mm from the polyethylene tube implanted with the substances on the back of the animals, employing Cavalieri principle, for the volume calculation in URL cuts (Mandarim de Lacerda, 2003). Thus, the two pieces obtained were included in paraffin and submitted to microtome. It was obtained 5 cuts of 5

µm thick semi-serialized (spacing 500/500mm) from each of the 2 pieces. The cuts semi-serialized were made until disappearing all the traces of the possible tissue reactions caused by material contained in the tube. It was obtained 83 blades with a total of 415 histological cuts.

The histological cuts were stained by hematoxylin and eosin (HE) and analyzed at Optical Microscope Nikkon Labphot II, with an eye grid, previously calibrated with a “bladed object” to indicate the Micrometric coefficient of each of the objective used for measuring the inflammatory reaction and the number of cells present in specific areas in the subcutaneous connective tissue of these animals, according to the method advocated by Mandarin-de-Lacerda (2003), for stereological analysis.

To hold a morphometric analysis and the calculation of the analyzed area of the inflammatory reaction was used a System-Test (Briarty, 1975), square composed by lines, previously calibrated with blade-object, with objective of 4x, with total area of 3.2mm x 1.8mm.

To calculate the number of polymorphonuclear and mononuclear present in the connective tissue located in front of the polyethylene tube it was used the same system-Test previously calibrated with objective of 100x, whose total area corresponds to 130 microns in length by 92 microns width. It was analyzed 5 random areas located in the connective tissue that presented or not inflammatory reaction to the paste or their components (Almeida and Souza, 2003).

The following histological events were evaluated in these areas: inflammatory reaction, rationale breadth area with the tube opening, polymorphonuclear and mononuclear presence and quality.

## RESULTS

The zinc oxide in the first week did not induce significant inflammatory reaction, which was restricted to an area of 1.34mm in length for three days and of 2.14mm to the 7 days from the tube implanted in the connective tissue of rats (table 2). In fifteen days it was observed a large increase in mononuclear and some polymorphonuclear reporting increased inflammatory reaction in an area of 5.24mm long (tables 1 and 2). It was noticed in thirty days a large increase in the quantity of mononuclear just expressing an inflammatory reaction around 5.96mm in length from the opening of a polyethylene tube (tables 1 and 2; fig. 3).

The thiamphenicol did not cause actually any inflammatory reaction in the subcutaneous connective tissue of rats in the first week (table 1). After fifteen days it was observed a discrete reaction measuring approximately 0.46mm along the pieces, with the presence of a few mononuclear, which is extended for 30 days indicating a character reaction more immune than fagocitary characterizing a chronic reaction .(table 2).

The tetracycline induced an inflammatory reaction with predominance of mononuclear three seven days after its implantation (tables 1 and 2) with a length of 4.18mm and 5.32mm, respectively, from polyethylene tube. The inflammatory reaction continues, however, chronically with an average of 2mm along the pieces with many mononuclear at 15 days (Table 2; fig.4).

The paste caused an inflammatory reaction with polymorphonuclear predominance three days after its implantation, but encapsulated and limited to the first cut along with the implanted tube in an area of 1.12 mm in length. At 7 days, on the five areas examined, it was observed a connective tissue reaction with a mean extension of 2.52 mm, in which only mononuclear was present (tables 1 and 2). The inflammatory reaction after 15 days it was

qualitatively, chronically small and a mean extension of 3.3 mm from the tube (tables 1 and 2). Thirty days after the endodontic paste implantation, no inflammatory reaction was observed in the tissue (tables 1 and 2; fig.5). In sham animals, which had only implant of the polyethylene sterile tube, were noticed normal connective tissue with few cells, summarized in fibroblasts and intercellular substances, demonstrating that the tube did not affect the animal connective tissue (fig.6).

Table 1: Calculation of mononuclear and polymorphonuclear cells in the “field-test” found by substance on the subcutaneous connective tissue of rats in 5 blades analyzed 3, 7, 15 and 30 days after the paste implantation or their components.

Days \ Subst	3 M	3 P	7 M	7 P	15 M	15 P	30 M	30 P
Zinc oxide	6	4	5	3	32	10	64	11
Tianphenicol	1	0	0	0	4	0	3	0
Tetracycline	9	2	7	0	17	1	5	0
Paste	4	6	6	0	2	0	0	0
Shan	0	0	0	0	0	0	0	0

**M-** mononuclear; **P-**polymorphonuclear **Shan-**control animals

Table 2: The inflammatory reaction extension measurement (mm) caused on the subcutaneous connective tissue of rats, 3, 7, 15 and 30 days after endodontic paste implantation or their components. The data are expressed as the average of 5 calculation areas, obtaining the density of cells in the test system in relation to the space analyzed.

Days \ Subst	3	7	15	30
Zinc oxide	1.34	2.14	5.24	5.96
Tianphenicol	1.86	0.00	0.46	0.20
Tetracycline	4.18	5.32	1.46	2.44
Paste	1.12	2.52	3.30	0.00

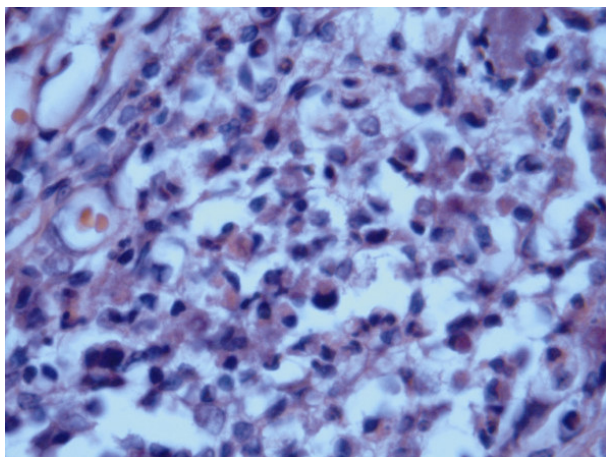


Fig. 3: Photomicrograph demonstrating the presence of polymorphonuclears in the subcutaneous connective tissue of rats thirty days after the zinc oxide implant (objective de 100X, HE staining).



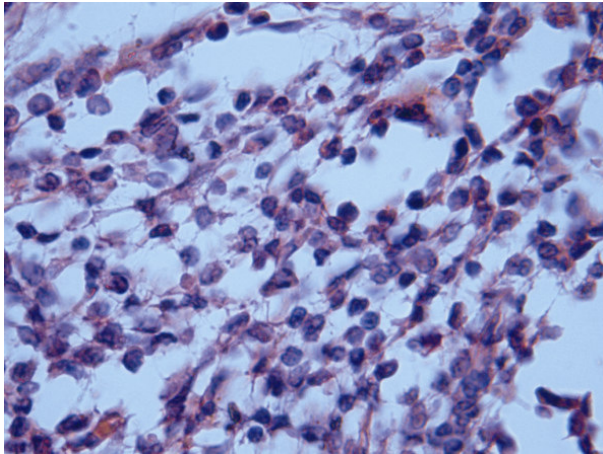


Fig. 4: Photomicrograph showing the presence of a large number of mononuclears in the subcutaneous connective tissue of rats 15 days after the tetracycline implantation (objective 100X; HE staining).

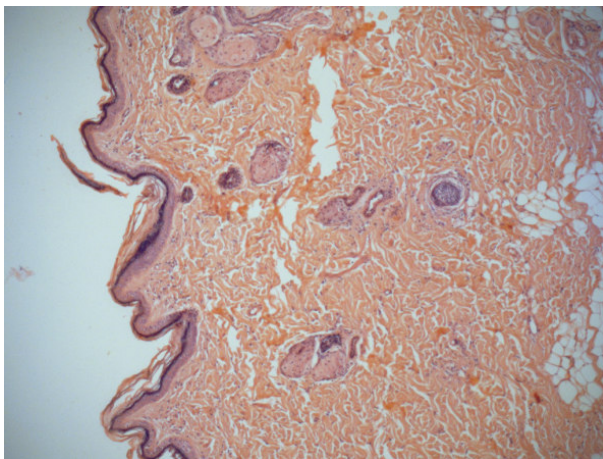


Fig. 5: Photomicrograph demonstrating the absence of inflammatory reaction in the subcutaneous connective tissue of rats 30 days after the endodontic paste implantation (objective 10X; HE staining)

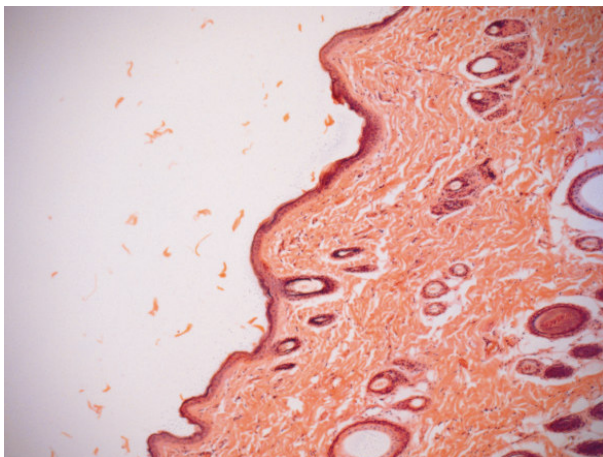


Fig. 6: Photomicrograph demonstrating the absence of inflammatory reaction in the subcutaneous connective tissue of sham rats, 15 days after polyethylene implantation tube (objective10X; HE staining).

## DISCUSSION

The biocompatibility definition says that a material to be biocompatible must exert specific functions when in contact with living tissue of a host, without, however, causing damage or harm to it (Estrela, 2005).

In the present study, it is analyzed the possibility of endodontic paste consisted of tetracycline, thiamphenicol and zinc oxide to be biocompatible. Thus, the paste and its constituents were implanted in the subcutaneous tissue of rats and the appearing or not of tissue reaction were evaluated 3, 7, 15 and 30 days after the implantation. The results obtained indicate that the paste studied induces to inflammatory reaction of low intensity, mainly fifteen days after its implantation and any reaction thirty days later, which suggests being the paste biocompatible with the living tissue.

In connective tissue can be seen different cell types as plasmocytes, lymphocytes, monocytes and macrophages (mononuclear cells) getting into the organism defense and repairing process that appear in the chronic inflammatory process. On the other hand, the

acute inflammation predominance is the polymorphonuclear cells such as lymphocytes and eosinophils (Junqueira and Carneiro,2003). Meanwhile, Guidugli (1997) showed that to assure to be the polymorphonuclear typical of acute inflammation and mononuclear of chronic inflammation is most of time too academic, because in some situations as in suppurative osteomyelitis (chronic) predominates neutrophils and viral infections (acute), mononuclear presence (Junqueira and Carneiro,2003). This study did not have the purpose to identify the cell types, but its presence characterizing the inflammation type.

The zinc oxide when applied alone showed to be the most toxic paste component, mainly 15 and 30 days after its implementation, which can be confirmed by the inflammatory reaction extent and the cell types present in large amount (polymorphonuclear). The results show and extend other results as those obtained by Koulaouzidou, et al (2005) that was shown to be the most cytotoxic zinc oxide. This irritating potential can be caused by the lack of Eugenol on the paste composition, because Costa et al., (1994) showed that the zinc oxide and Eugenol paste induce to an inflammatory reaction with mononuclear predominance in thirty days after its implantation. Kielbassa et al., (2007) stated that the paste consisted of zinc oxide and Eugenol induced the formation of a fibrous capsule that prevents the re-absorption. Moreover, other works have shown the therapeutic effect of Eugenol in the dental pulp connective tissue (Watts and Paterson, 1987; Sübay et al.,1990).

The thiamphenicol is a broad antifungal spectrum, derived from the chloramphenicol, which acts on the gram-positive and gram-negative micro-organisms, acting by inhibiting bacterial protein synthesis (Shibli et al., 1995). When evaluated separately the thiamphenicol induced a discreet inflammatory reaction in the connective tissue, only from the second week and which extended until 30 days after its implantation, but chronic, demonstrating to be thiamphenicol a medicine with little irritating potential on the connective tissue.

Another important factor on the researches about the endodontic paste is tetracycline, which is linked in different levels to plasma proteins, forming complexes with calcium. Thus, tetracycline is deposited along with calcium during the bone, dentin and cement calcification. The paste constitution is due to the fact of being active against gram-positive and gram-negative micro-organism, anaerobic bacteria, facultative anaerobic and spirochetes, which are part of the pulpal and periapical infections (Windley et al., 2005).

Besides, the tetracycline influences the bone tissue regeneration, including the chemiotatic effect to osteoblasts and anticolagenolitic activity, which contributes significantly to the new bone formation (Chung et al., 1997), demonstrating that the tetracycline has biological compatibility. The results obtained in the present study showed that this antimicrobial was able to induce inflammatory reaction in the connective tissue of rats that had its highest intensity 15 days after the implantation; however, with a mononuclear predominance suggesting to be a chronic inflammatory process.

All these components when associated originate a paste that was capable of inducing, 3 and 7 days after its implantation, an acute inflammatory reaction, however, restricted (1.12 mm in average), with mononuclear predominance. Later there was a qualitative regression of cells and after thirty days it was not observed inflammatory reaction. Based on the results obtained in this present study, it is inferred the hypothesis that the inflammatory reaction caused by paste composed by thiamphenicol, tetracycline and zinc oxide is very small and it can characterize the biocompatibility of it to the connective cavity filling tissue. Working with materials for covering the cavities, Oliveira et al., (1997), concluded that the materials are biologically acceptable, when in contact with the subcutaneous connective tissue of rats, occurs repairing in the area during the experiments. When the reaction is considered small it can be said that the material used is biocompatible.

Costa et al., (1996) concluded that the zinc oxide and Eugenol present acceptable biocompatibility as it was observed a reaction with an area of 0.347 mm sixty days after its utilization. Moreover, Minarelli and Roslindo (2003), concluded from the experiments held with prime bond that it is biocompatible after observing the histological event regression.

From the results obtained, it is needed to continue the biocompatibility tests of the referred paste, now applying to the material in test on the teeth of animals that have these structures similar to the human beings.

## **CONCLUSION**

The paste consisted of thiamphenicol, tetracycline and zinc oxide can be considered biocompatible due to the area limitation and the quality of inflammatory cells found, being the zinc oxide alone the most irritating element of its composition due to the polymorphonuclear presence still after 30 days.

## REFERENCE LIST

- Ajimura K T., Ferelle A., Akatsu T, Estudo comparativo da biocompatibilidade de um cimento à base de antibiótico contendo tianfenicol, tetraciclina e óxido de zinco com cimento de óxido de zinco e eugenol, em tecido subcutâneo de rato, XI Encontro Anual de Iniciação Científica, Universidade Estadual de Maringá, Maringá PR, 4/10/2002.
- Almeida R. J. Souza C.J.A.S., “Biocompatibilidade de Materiais endodônticos em Odontopediatria: Avaliação histológica da resposta inflamatória, por meio de implantes intra-ósseo em cobaias guinea-pig”. Mestrado em ENDODONTIA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. 22p, 2003.
- Amorim LFG, Toledo OA, Estrela CRA, Decurcio DA, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal fillings pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J* 2006; 17: 317-322.
- Anusavice, K.J.; *Materiais Dentários Philips*, Elsevier, p.162-189. 11ª Ed. 2005.
- Barja-Fidalgo F.Hirata-Junior R., Oliveira B.H., Avaliação da ação antimicrobiana in vitro de 5 pastas utilizadas no tratamento endodôntico de dentes decíduos, *Braslian Oral Research*. Vol.21, sep. p311, 2007.
- Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17:380-383.
- Briarty L.G., *Stereology: methods for quantitative light and electron microscopy*, Sci.Prog., Oxsford, 1-32,1975.
- Cappiello J. Nuevos enfoques em odontologia infantil. *Rev. Circ. Odonto Rosário*, v.52, p.138-145, 1964.
- Chung M C., Ferreira E I., *Química Nova*, O Processo de Latenciação no Planejamento de Fármacos, 1997, 75-85.

Costa C.A.S. Benatti Neto C. Abdalla R. E., Gonzaga H. F. S., Lia R. C. C., Estudo preliminar da compatibilidade biológica de um cimento à base de antibiótico e óxido de zinco e eugenol quando implantado em tecido subcutâneo de rato. Rev. Odont. Univ. São Paulo, v 8, n 1, p 65-70, 1994.

Costa, C.A.S. Hebling I.; Teixeira, M.F. Compatibilidade biológica do tecido conjuntivo subcutâneo de rato ao implante de cimento de óxido de zinco e Eugenol (OZE), variando a proporção pó/líquido e o tempo de envelhecimento do Eugenol. Rev. Odontol. Unesp v.25, n.1, p.135-44, 1996.

De Deus, Endodontia, Medsi, pag. 208-211, 2002.

Desai, M Gulabivala K., Ng Y.L. & Spratt D., Co-aggregation studies on bacteria from infected root canals, International Endodontics Journal, v37, 345-347, 2004.

Estrela, C. Metodologia Científica, Artes Médicas, p.231-273, 2005.

Guidugli N.. Elementos de Patologia Geral. São Paulo: Santos, 1997.

Junqueira L & Carneiro J. Histologia Básica, Guanabara Koogan, p.92-120, 2003.

Kielbassa, A.M., Uchtmann H., Wrbas T., Bitter K., et al, In vitro study assessing apical leakage of sealer-only backfills in root canals of primary teeth. Journal of Dentistry, v 35, issue 7, July, 2007.

Koulaouzidou, E.A., Konstatinos T. P., Economides N.A., Panagiotis B., Kortisaris A. H. Antiproliferative Effect of Mineral Trioxide Aggregate, Zinc Oxide-Eugenol Cement, and Glass Ionomer cement Against Three Fibroblastic Cell Lines, Journal of Endodontics, vol.31, n 1 jan., p44-46., 2005.

Mandarim de Lacerda C.A. Stereological tools in biomedical research, Na. Acad. Bras. Cienc. 469-86, 2003.

Mattfeldt T, Krämer K L , Zeitz R and Mall G Stereology of myocardial hypertrophy induced by physical exercise Virchows Archiv, 473-484 1986 .

Melker, K. B., Vertucci F. J., Rojas M. F. Progulsk-Fox A., Bélanger M. Antimicrobial efficacy of medicated root canal filling materials, Journal of endodontics, vol 32, n 2, p 148-151, 2006.

Minarelli G. A.M.; Roslindo B., E. Histologic analysis of the effects of an dentin adhesive prime bond 2.0 in pulp of rats., Rev. Odontol. UNESP v. 32, n. 2, p. 105-111, jul./dez. 2003.

Oliveira M. R. B., Boldrini, S. C. Comelli R. C. Lia C. B. Neto, Compatibilidade Biológica de Materiais Odontológicos Fotopolimerizáveis e Ativados Quimicamente, Utilizados no Forramento de Cavidades (Baseline e Baseline Vlc), Rev. Odontol. UNESP, São Paulo, 26(2): 255-264 1997

Oliveira MRB & Zamperini CA, Avaliação biológica em tecidos conjuntivos de ratos de materiais odontológicos utilizados para proteção pulpar. Brazilian Oral Research. Vol.21, sep, p316. . 2007.

Perdiza, Walter, Bol. Da F.F. O. Rib. Preto, vol.II n 2 Tratamento conservador da polpa, p. 137-140 1964.

Shay, D.E. Uso de antibióticos para conservação da vitalidade pulpar, J. Den. Children, p.27-35, 1960.

Silva L.A. B.da, Perassi F.T., Iro I.Y., Yamashita J.C., Bonifácio K. C., Tanomaru Filho M. A presença de fungos nas infecções endodônticas, UNIMEP, v12, n 1 e 2 jan./dez, 2000.

Souza S. M. G., Bramante C. M., Taga E. M., Biocompatibility of EDTA, EGTA and Citric Acid, Braz Dent Journal, n 16, p 3-8, 2005.

Sunde, Pia Titterud, Olsen Ingar, Debelian Gilberto, Tronstad Leif, Microbiota of Periapical Lesions Refractory to endodôntico therapy, Journal of endodontics, vol.28, n4, p304-310, 2002.



Takahashi, K., Dezan-Junior E., Cunha RF, Avaliação da Resposta Tecidual às pastas Guedes Pinto e de Hidróxido de Cálcio, Análise Edemogênica e ao Microscópio óptico em ratos, Brazilian Oral Research. Vol.21, sep. P 310. 2007.

Tronstad, L.Barnett F.,Cervone F., Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodôntico treatment, Endodontic e Dental Traumatology, v 6, pag. 73-77, 1990.

Walther, L. F. Odontologia e comunidade, p 6-11, 1965.

Watts A. and Paterson R.C., Pulpal response to zinc oxide-eugenol cement, International Endodontic Journal ,V. 20 Issue 2 Page 82-86 March 1987.

Windley, W., Teixeira F., Levin L., Sigurdsson A., Trope M., Disinfection of I mmature Teeth with a Triple Antibiotic Paste, JOE, vol 31 n 6 Jun 2005.

Vigil, G.V.Wayman B.E., Dazey S.E., Fowler C.B., Bradley Jr. D.V., Indentification and antibiotic sensitive of bacteria isolated from periapical lesion, Journal of Endodontics, 23(2):110-114, feb.1997.

Shibli A. M. Pechere C,\*M. Ramadan A. "College of Pharmacy, King Saud University, P.O. Box: 2457, Riyadh 11451, Saudi Arabia 'Department of Genetics and Microbiology, Centre Medical Unwersitaire,1211 Geneva 4, Switzerland, Postantibiotic effect and host-bacteria interactions. Journal of Antimicrobial Chemotherapy (1995) 36, 885-890

Sübay R.K., Cox C. F., Kaya H., Tarim B., Sübay A.A., Nayr M., , Human pulp reaction to dentine bonded amalgam restorations: a histologic study. Journal of Dentistry, Volume 28, Issue 5, Pages 327-332,1990.

## APÊNDICES

## Apêndice A

Tabela 1 com o resultado do total da contagem de células, em cinco áreas aleatórias em cada dia de controle, para cada substância, nos cortes histológicos.

Cels Subst	3 M	3 P	7 M	7 P	15 M	15 P	30 M	30 P
Óxido de zinco	6	4	5	3	32	10	64	11
Tiafenicol	1	0	0	0	4	0	3	0
Tetraciclina	9	2	7	0	17	1	5	0
Pasta	4	6	6	0	2	0	0	0
shan	0	0	0	0	0	0	0	0

**M**-mononucleares

**P**-polimorfonucleares

**Shan**-animais controle

**Apêndice B** - Medida em milímetros da extensão da reação inflamatória do tecido conjuntivo de rato às substâncias implantadas no dorso dos animais em cada dia do experimento em 5 áreas aleatórias.

Dias Subst	3 dias	7 dias	15 dias	30 dias
tianfenicol	0mm	0mm	0mm	0mm
	1,2mm	0mm	0mm	0mm
	3,6mm	0mm	0mm	0mm
	2,7mm	0mm	1,8mm	0mm
	1,8mm	0mm	0,5mm	0mm
tetraciclina	6,4mm	8mm	1,8mm	0mm
	5,4mm	6,4mm	0,9mm	3,5mm
	3,7mm	3,2mm	0,5mm	3,7mm
	4,2mm	5,4mm	1,8mm	1,8mm
	1,2mm	3,6mm	2,3mm	3,2mm
Óxido de zinco	0mm	1,2mm	3,6mm	6,4mm
	0mm	0,5mm	5,4mm	7,4mm
	2,7mm	1,8mm	5,4mm	6,4mm
	2mm	3,6mm	8,2mm	3,2mm
	2mm	3,6mm	3,6mm	6,4mm
pasta	0mm	1,8mm	5mm	0mm
	0,5mm	3,6mm	3,7mm	0mm
	1,8mm	2,5mm	4,2mm	0mm
	1,7mm	1,3mm	1,8mm	0mm
	1,6mm	3,4mm	1,8mm	0mm

**Apêndice C** - Fotomicrografias das lâminas feitas com sistema de captura Q Capture Pro e microscópio Olympus B X 41

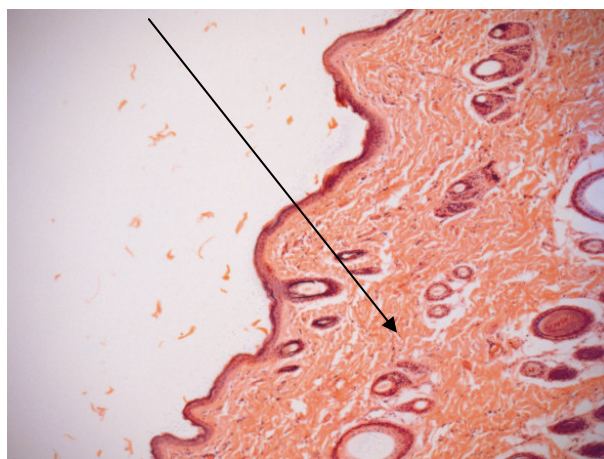


Foto1: lâmina do tecido conjuntivo de animal shan com 30 dias de experimento e aumento de 40X- A seta indica o tecido conjuntivo normal com fibras colágenas e substância intercelular e ausência de células inflamatórias.

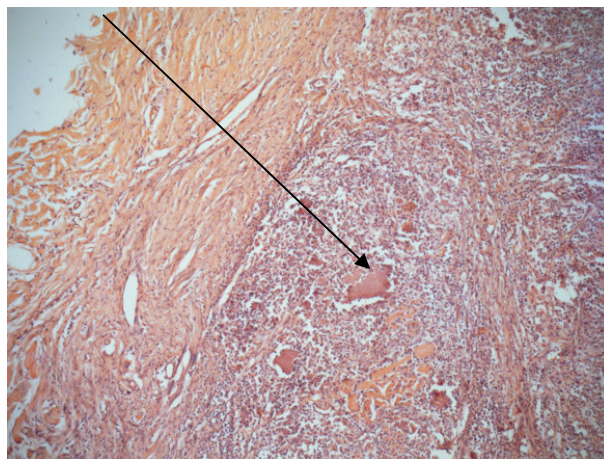


Foto2 lâmina com implante de óxido de zinco 30 dias aumento de 100 X- a seta indica intensa proliferação celular no tecido conjuntivo do animal demonstrando intensa reação inflamatória.

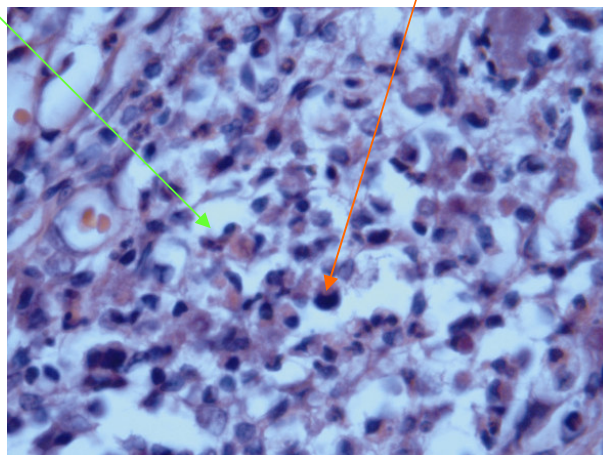


Foto3 - de lâmina do tecido conjuntivo de rato com aumento de 1000X de implante de óxido de zinco aos 30 dias. A seta amarela indica um polimorfonuclear e a seta verde um mononuclear.

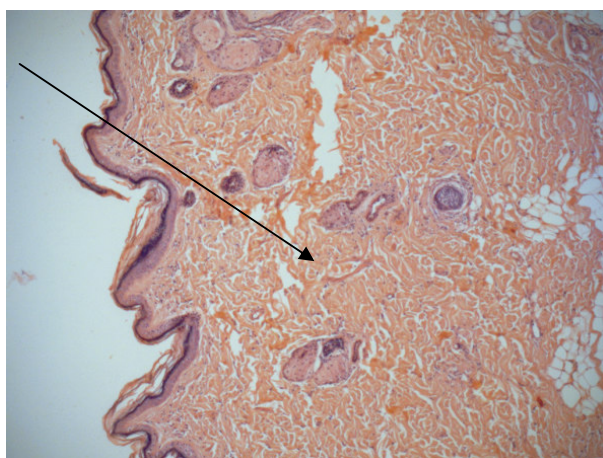


Foto 4 - de lâmina do tecido conjuntivo de rato com implante da pasta aos 30 dias com aumento de 100X A seta indica um tecido conjuntivo normal apenas com grande quantidade de fibroblastos, demonstrando uma reação cicatricial do tecido conjuntivo.

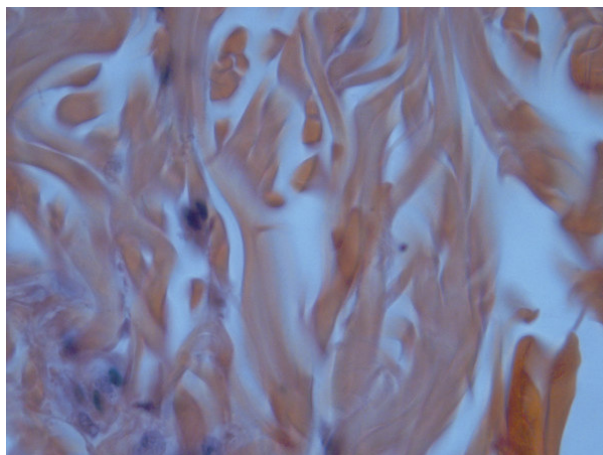


Foto 5 de lâmina com implante da pasta em pesquisa em 30 dias de experimento com aumento de 1000X, mostrando normalidade do tecido conjuntivo com apenas maior densidade de fibroblastos.

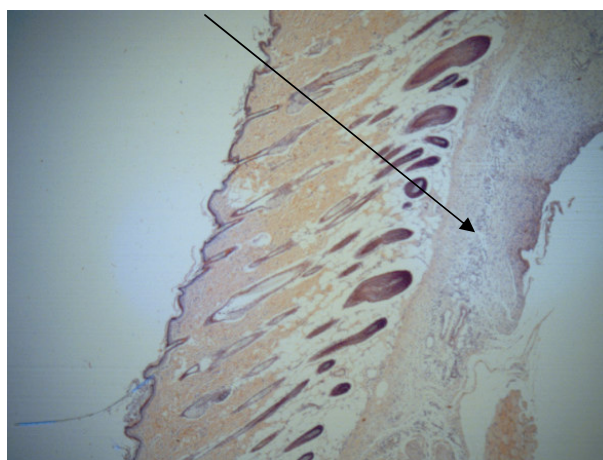


Foto 6 - de lâmina após implante de tetraciclina aos 7 dias de experimento com aumento de 40X, mostrando reação inflamatória.( seta)



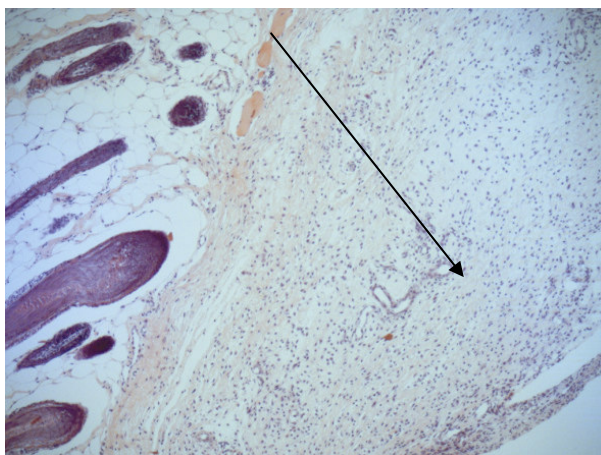


Foto 7 - de lâmina de tecido conjuntivo de rato com implante de tetraciclina aos 7 dias mostrando reação inflamatória com aumento de 100X.

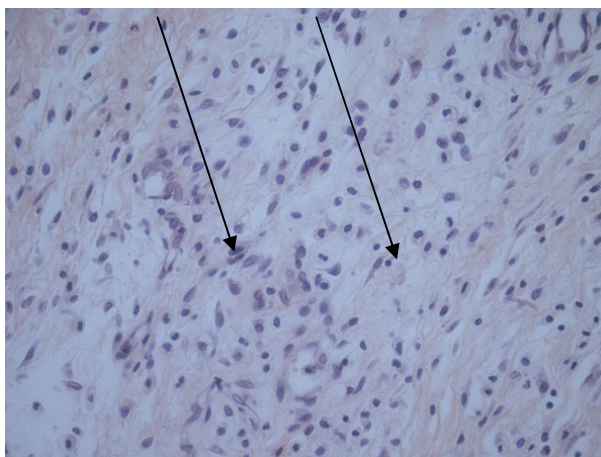


Foto 8 - de lâmina com aumento de 400X após implante de tetraciclina aos 7 dias. Indicando células mononucleares.



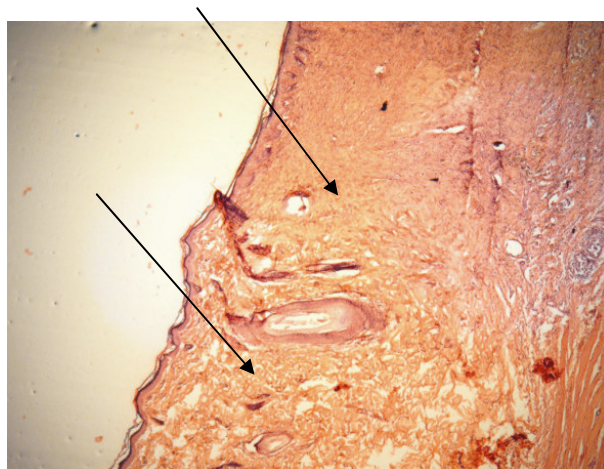


Foto 9 - de lâmina com aumento de 100X após implante da tetraciclina aos 15 dias. Mostrando com as setas a diferença do tecido conjuntivo na área do tubo (seta superior) e tecido conjuntivo normal na periferia do tubo

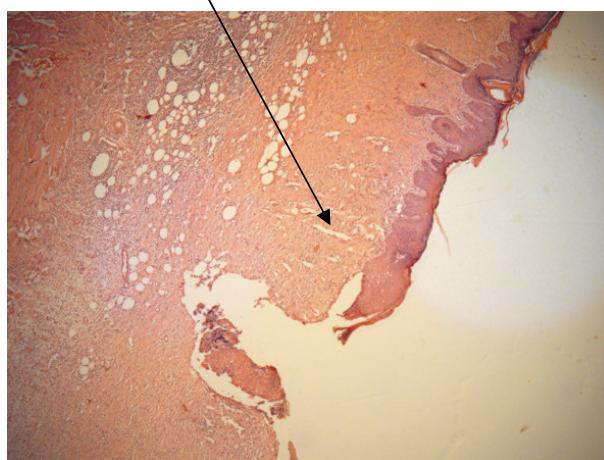


Foto 10 - da lâmina com aumento de 40 X mostrando intensa reação inflamatória à tetraciclina aos 15 dias de experimento.

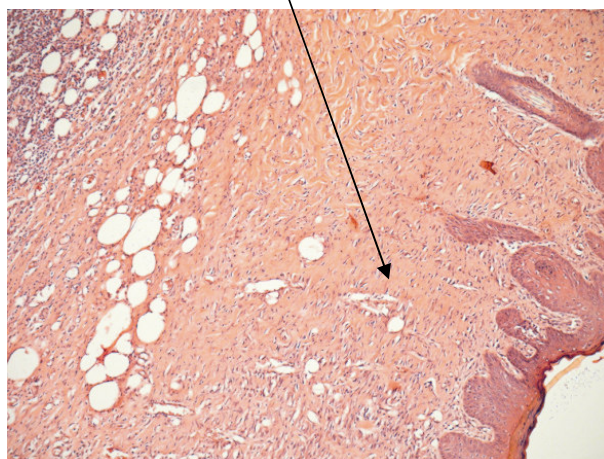


Foto 11 - de lâmina aos 15 dias após implante de tetraciclina com aumento de 100X mostrando proliferação celular denotando reação inflamatória.

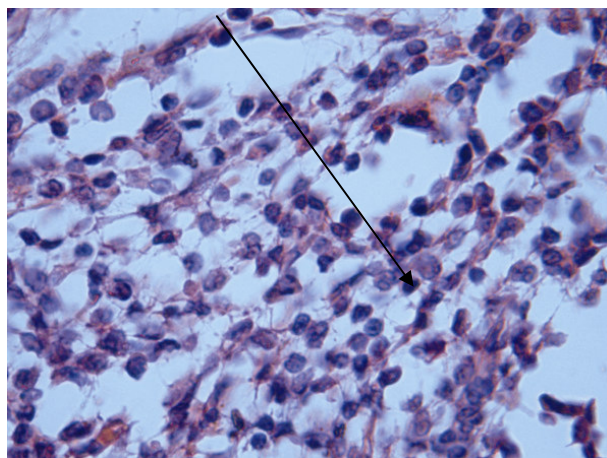


Foto 12 de lâmina aos 15 dias do experimento após implante de tetraciclina com aumento de 1000X, mostrando na seta uma célula mononuclear



Foto 13 - de lâmina aos 30 dias de animal shan com 100X, mostrando normalidade do tecido conjuntivo.

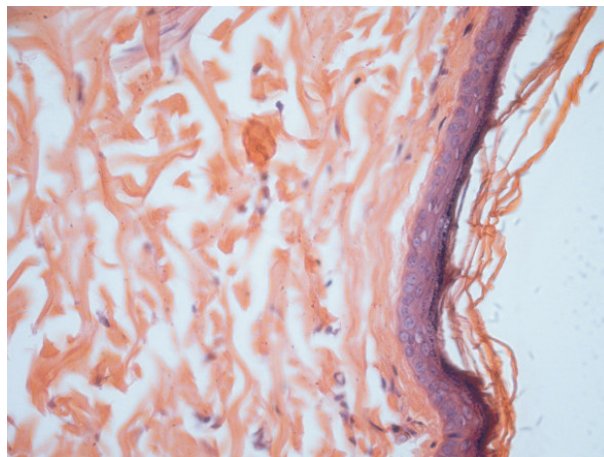


Foto - 14 de animal shan aos 30 dias.400X de aumento.

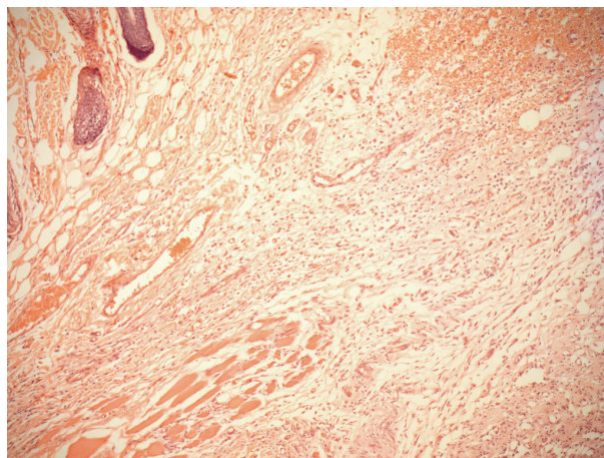


Foto 15 - do tecido conjunivo de rato com implante da pasta em pesquisa aos 15 dias com aumento de 100X mostrando reação inflamatória.

## **Apêndice D - Produção científica durante o mestrado**

### **1 Produção Bibliográfica**

#### **1.1 Resumos simples em anais de eventos ou publicados em periódicos.**

Mattos E.C.G.; Balladelli, Ana; Régis G., Ribeiro,D., Os problemas da especialidade de endodontia nos Centros de Especialidade Odontológica,Ciopar, Curitiba,2007.

Mattos E.C.G.; Prates LHM, Guedes LLS; Rodrigues Filho R, Chain MC, Avaliação da resistência de união de cimentos resinosos convencionais e autocondicionantes.Painel. 24 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica e 2 Reunião da Federação Latinoamericana/IADR, 2 a 4 de setembro de 2007.

Mattos E.C.G.; Prates LHM, Guedes LLS; Rodrigues Filho R, Chain MC Avaliação da resistência de união de cimentos resinosos convencionais e autocondicionante pela técnica de microtração- **trabalho premiado no Concurso de Pesquisa com Rely X Unicem, realizado pela 3M ESPE em 2006.**

Sander, R.F., Guedes, L.S., Mattos, E.C.G.;Rosário H. Porcelanas, técnicas - Congresso Catarinense de Odontologia, nov.2006.

Mattos, E.C.G., Guedes, L.S.; Sander. R.F.; Rosário H. Propriedades mecânicas da resina de acetato-Congresso Catarinense de Odontologia, nov.2006.

## 1.2 Artigos completos publicados em periódicos

GUEDES, L. L. S.; MATTOS, E. C.G. de; ZANI, I.M.; PRATES, L. H.M. e CHAIN, M. C. Avaliação das propriedades Mecânicas de Cimentos Resinosos convencionais e Autocondicionantes. **Revista de odontologia da UNESP**, Araraquara, SP, v. 37, n. 1, 2008.

## 1.3

## 1.3 Artigos completos enviados para publicação em periódicos

Mattos, E.C.G.,Chain M.C. Soares AR.S.. ; Smânia E., Smânia F; Rodrigues Filho, R, In vitro antimicrobial activity of endodontic paste prepared with tetracycline, thiamphenicol and zinc oxide assessed using agar diffusion method.*Brazilian Dental Journal*,2008.

MattosE.C.G; Chain M.C.; SantosA.R.S.; Tramonte R; Rodrigues Filho

Biological compatibility of the endodontic paste prepared with tetracycline, thiamphenicol and zinc oxide implanted on the subcutaneous tissue of rats.*International Journal of Odontoestomatology*, 2008

## **ANEXOS**



**Anexo A****Resultado de Solicitação de Protocolo****Protocolo**

PP00095

**Título**

Biocompatibilidade e Atividade Antimicrobiana da Pasta Endodôntica formada por Tetraciclina, Glitizol e Óxido de Zinco

**Data de Entrada**

03/12/2006

**Resultado:**

Aprovado

**Data/Prazo**

09/05/2007

**Considerações**

Ofício nº 056/CEUA/PRPe/2007

Do: Presidente da Comissão de ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Rubens Rodrigues Filho

Departamento de Estomatologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade o Presidente da CEUA deliberou o seguinte:

- APROVADO, por 1 (hum) ano, para a utilização de 36 ratos (*Rattus norvegicus*).

Por ocasião do término desse protocolo, DEVERÁ SER APRESENTADO RELATÓRIO detalhado relacionando o uso de animais no Projeto desenvolvido aos resultados obtidos, conforme formulário ON LINE CEUA.


Atenciosamente,

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi

Presidente-interino/CEUA/PRPe/UFSC

**Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)****Data 24/08/2008**

Data 24/05/2007

**Parecer(es):**  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi  
Comitê de Ética Para o Uso de Animais – PRPE - UFSC  
Presidente

**Anexo B****DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que os dados coletados na pesquisa intitulada Análise da biocompatibilidade e antibiograma da pasta composta por tetraciclina, tiafenicol e óxido de zinco, serão arquivados em papéis, disquetes e no computador pessoal da pesquisadora principal, Elisabeth Cristina Gomes de Mattos, sob posse e supervisão desta, e serão utilizados tão somente para fins de publicações, em revistas indexadas nacional e/ou internacionalmente.

Florianópolis, \_27\_\_\_ de \_fevereiro\_\_\_\_\_ de 2008.

---

Prof. Dr. Rubens Rodrigues Filho  
Orientador do projeto

---

Prof. Dr. Marcelo Carvalho Chain  
Co-orientador do projeto

---

Dra. Elisabeth Cristina Gomes de Mattos



## **Anexo C - Metodologia expandida da técnica HISTOLÓGICA**

O método mais comumente usado em histologia é o método que permite a obtenção de preparados histológicos permanentes, as lâminas, para estudo em Microscopia Óptica.

Para a preparação das lâminas usadas neste estudo, para contagem de células e análise da área inflamada observada no tecido conjuntivo de ratos, após o implante da substância estudada, seguiu-se as seguintes etapas no laboratório de histologia do departamento de ciências morfológicas da UFSC. A metodologia a seguir baseia-se no protocolo descrito na apostila de técnicas histológicas do mesmo departamento.

*Obtenção do Material:* A etapa de obtenção das biópsias dos tecidos conjuntivos no caso desta pesquisa, é de suma importância para possibilitar uma correta obtenção das lâminas que nos permitiram alcançar o objetivo proposto.

*Animais de Laboratório:* Nesta pesquisa foram utilizados ratos da Linhagem Wistar

São animais que por sua simplicidade de tratamento, docilidade, pequeno porte, etc., se ajustam perfeitamente aos experimentos desta pesquisa.

Estes animais foram obtidos do biotério central da UFSC, após aprovação do projeto desta pesquisa pela CEUA exposto em anexo.

É importante fazermos a pesquisa em animais saudáveis, devidamente preparados para pesquisa. Neste intento primeiramente, um Biotério deve possuir:

@ fácil higienização;

@ aparelhagem mínima: gaiolas, janelas, tanques etc.;

@ farta alimentação;

@ água potável;

@ veterinário etc.

### **Animais utilizados-figura 1**

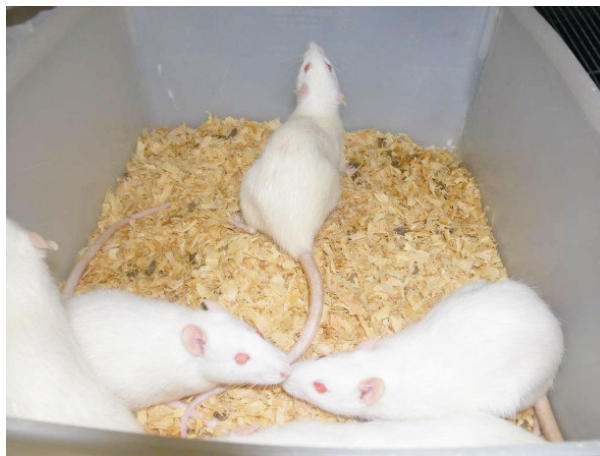


Fig.1 Animais utilizados no experimento

#### *Coleta das Peças:*

##### *Apreensão e sacrifício do animal:*

A forma mais comum de sacrificar um animal é através de uma dose excessiva de anestésico (hidrato de cloral, uretana, ketalar etc.) Nesta pesquisa utilizamos dose excessiva de tiopental ou ketamina e xilasina. É fundamental que na utilização de qualquer animal em laboratório sigam-se rigorosamente todas as normas estabelecidas pelos órgãos responsáveis pela proteção do meio ambiente. Atualmente existem regras claras estabelecidas por órgãos federais sobre o uso de animais em pesquisa ou em laboratórios de qualquer natureza, conforme mostrado abaixo:

- 1-**É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.
- 2-**Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvar das manobras experimentais e da dor que possam causar.
- 3-**É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal.

**4-**É relevante considerar a importância dos estudos através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

**5-**Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

**6-**Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos “*in vitro*” , utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

**7-**Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros humanos, salvo se demonstrados cientificamente, resultados contrários.

**8-**Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralisantes e não anestésicos.

**9-**Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

**10-**Disponer de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies mantidas para experimentação ou docência.

**11-**Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

**12-**Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

**Fonte:COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal)**

## 2.2-Redução das Peças: Macroscopia

É o procedimento primeiro, onde os órgãos extraídos são seccionados em fatias menores a fim de serem levados ao fixador, no menor espaço de tempo possível, a fim de evitar autólise.

Nesta etapa do processo é crucial que o pesquisador tenha cuidado em fornecer uma **superfície de corte** do órgão a ser incluído em parafina. Tal fato possibilita que durante o processo de microtomia o pesquisador saiba exatamente qual o plano de corte a ser empregado. Fizemos nesta pesquisa os cortes em dois níveis para seguirmos os preceitos da estereologia.

**MACROSCOPIA:** Nesta pesquisa fizemos o corte da peça em mais ou menos 3mm por 1 cm.Fig.2

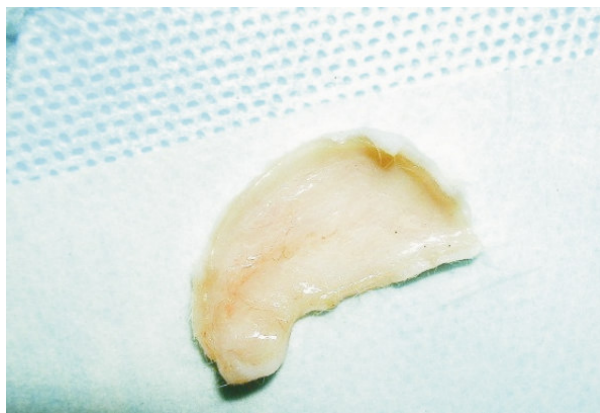


Fig. 2 aparência da biópsia.

### **Técnica Histológica de Rotina:**

Para o preparo das lâminas, os órgãos precisam ser reduzidos à cortes (fatias extremamente delgadas de um pequeno fragmento de tecido), que permitam a sua visualização ao M.O.

Estes cortes são feitos com um instrumento denominado **micrótomo**. O que se deseja é levar ao Microscópio um preparado no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos.

Apesar de todos os cuidados tomados, esse ideal não é totalmente alcançado, uma vez que se observa em todos os preparados histológicos certos artefatos conseqüentes do processamento

que sofreram. Nesta pesquisa os cortes seriados foram feitos de 500 micrometros em 500 micrometros. Figs.3

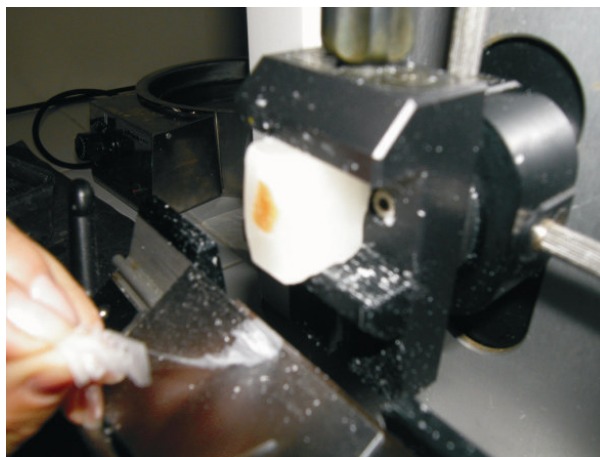


Fig. 3-Micrótomo – corte da peças.

### ***Fixação:***

Denominam-se fixação aos procedimentos que visam manter de modo definitivo as estruturas citológicas e histológicas dos vários tecidos. Em outras palavras, a fixação visa evitar a deterioração dos tecidos que permitem a realização das inúmeras técnicas citológicas e histológicas para o estudo das células e tecidos.

Os quatro fixadores que podemos selecionar são: o *formol*, o fixador de *Boiun*, o fixador *Helly* e o *Zenker*. A experiência nos mostra que não existe fixador ideal e que todos os fixadores apresentam vantagens e inconvenientes. O estudo empírico dos fixadores ao longo dos anos demonstrou que se obtém melhores resultados quando se associam vários fixadores em uma fórmula só. Sem dúvida um dos fixadores mais utilizados em histotécnica é o *formol* e provavelmente é devido a sua simplicidade de preparo e baixo preço. É preciso porém que se diga que este fixador tem suas limitações e quando utilizado inadequadamente dá resultados bastante precários. Nesta pesquisa utilizamos o *formol* á 10% por 48 horas.

Regras para obtenção das lâminas:

Tente sempre que possível, usar material fresco de animais sacrificados recentemente;

Sempre que possível, não utilize fragmentos de tecidos de **mais de 3 milímetros de espessura**, uma vez que os fixadores dificilmente penetram mais do que esta espessura em tempo hábil para evitar a deterioração dos tecidos;

Evite pinçar ou manipular os tecidos que vão ser fixados. Para obter fragmentos de tecidos de tamanho adequado, aconselhamos o uso de giletes bem afiadas e utilização da pinça apenas na extremidade ou regiões muito limitadas do tecido a ser analisado.

Use, no mínimo, um volume 20 vezes maior de fixador do que do tecido a ser fixado, pois, se a quantidade de fixador é insuficiente para reagir com o tecido, os resultados fatalmente serão pouco satisfatórios;

Fixe os tecidos pelo tempo necessário, agitando os frascos periodicamente a fim de que haja uma mistura adequada do fixador com o material a ser fixado. O tempo necessário para cada fixador varia com o tipo de fixador e com a espessura do tecido utilizado. De um modo geral deve-se fixar tecidos de não mais de 3 milímetros de espessura por períodos oscilando entre 4 a 24 horas.

PROCESSAMENTO DA PEÇA - Nesta pesquisa fizemos da seguinte forma:

As peças cortadas em biópsia ficaram imersas no:

1-Álcool 90% - 1 h de imersão, passou-se então para outro recipiente com

2- Álcool Absoluto - 1 h

3- Álcool Absoluto - 1 h

4- Álcool Absoluto - 1 h

5- Álcool Absoluto - 1 h

6- Xilol - 1 h

7- Xilol - 1h

8- Parafina a 60' - 1 h

9- Parafina a 60° - 1 h ou mais



Fig. 4 peça incluída em parafina líquida

### ***Inclusão***

Denomina-se de inclusão ao procedimento que tem como finalidade impregnar os tecidos com uma substância de consistência firme que permita em etapa posterior cortá-los em fatias finas para depois corá-los, possibilitando assim a sua visualização no microscópio.

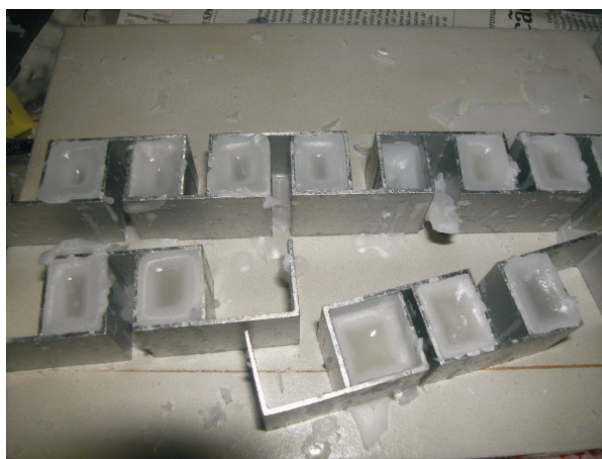


Fig. 5 - confecção dos blocos de parafina histológica para posterior corte no micrótomo



Fig. 6 - Blocos de parafina contendo as peças da biópsia após tratamento.

Várias substâncias são utilizadas para a inclusão, como por exemplo, a celoidina, parafina, gelatina, carbowax, etc. Carbowax é o nome comercial de uma cera sintética hidrossolúvel.

Pelo fato de ser mais simples e dar bons resultados, a quase totalidade das inclusões é feita em parafina, razão pela qual vamos nos restringir a explicar apenas este método. A inclusão consta de várias etapas, a saber: **desidratação, diafanização e impregnação.**

Como a parafina é um composto não miscível na água a primeira etapa da inclusão (a **desidratação – banhos de álcool a 70%, 90% e 100% ou seja, álcool absoluto**) se dedica à retirada da água dos tecidos e a sua substituição por álcool, na segunda etapa (**diafanização**), o álcool presente nos tecidos é substituído por xilol, e finalmente na **impregnação** o xilol é substituído por parafina fundida entre 56-58° C.

Uma vez impregnados os tecidos são colocados em pequenos recipientes contendo parafina fundida deixando-se a parafina endurecer. Fig.4 Fragmentos de órgãos assim envoltos por parafina sólida recebem o nome de **blocos**.

A mistura de parafina pode ser reutilizada. Convém filtrá-la periodicamente, o que é feito facilmente utilizando um funil com papel de filtro colocado dentro de um frasco, ambos mantidos em estufa a 60° C.



Após o último banho de parafina os fragmentos de órgãos são transferidos para um recipiente contendo parafina fundida e são encostados ao fundo do recipiente na orientação desejada, para serem cortados posteriormente. Recomendamos que os fragmentos, após a fixação, devem ser recortados ficando com uma superfície plana que deverá encostar-se ao fundo do recipiente utilizado. Após a solidificação total da parafina os blocos são aparados em forma de pirâmide truncada com o auxílio de uma navalha afiada, de modo que reste apenas uma orla de mais ou menos 2 mm de beirada do(s) fragmento(s). As pirâmides dos blocos devem ser paralelas entre si. Deve-se retirar o excesso da parafina da base da base da pirâmide, a fim de que ela não fique demasiado alta.

Os blocos assim aparados são presos com o auxílio de uma espátula aquecida a um taco retangular de madeira ou suporte de metal apropriado, que vem com o micróto.

### ***Microtomia***

É esta a etapa mais importante e difícil da técnica histológica e consiste basicamente em obter cortes sucessivos dos blocos de parafina contendo fragmentos de órgão. Estes cortes são obtidos graças ao uso do aparelho **micróto** ( **fig7**) que costa essencialmente de uma navalha de aço especial muito bem afiada e um braço, ao qual se prende o bloco e que se desloca verticalmente para cima e para baixo. O micróto é construído de tal maneira que, quando o braço com o bloco chega no fim da sua excursão de baixo para cima, ele avança em direção da navalha alguns micrômetros, de modo que quando o braço desce ele deixa na navalha uma fina fatia do tecido incluído.

É extremamente importante na microtomia (fig.8) que a navalha esteja muito bem afiada. Este processo pode ser feito manualmente, mas é de aprendizado difícil, longo e tedioso. Na maioria dos laboratórios as navalhas são afiadas por aparelhos construídos especialmente com esta finalidade.

Na impossibilidade de aquisição do afiador de navalhas, ou se o investigador assim o desejar, existe a opção de utilizar para a microtomia lâminas descartáveis em vez de navalhas.

Os micrótomos têm um mecanismo pelo qual se pode controlar a espessura dos cortes a serem obtidos. Com raras exceções, quando mais fino o corte, melhores os resultados, porém não é fácil em material incluído em parafina obter cortes de 3 a 4 $\mu$ m de espessura. Em geral trabalha-se com cortes entre 5 a 7 $\mu$ m. Ocasionalmente algumas técnicas exigem cortes entre 10 a 15  $\mu$ m. É de grande importância em microtomia a obtenção do ângulo adequado entre a face cortante da navalha que olha para o bloco e a face do bloco que olha para a navalha. Este ângulo deve oscilar entre 5 e 10° variando um pouco de acordo com a dureza do bloco a ser cortado. Geralmente nos bons micrótomos existe um dispositivo no qual é possível regular o valor deste ângulo que é fundamental para se obter bons cortes. O uso adequado e eficiente do micrótomo e a afiação da navalha são, além do aspecto técnico, uma arte e devem ser aprendidas com pessoa competente e paciente, pois é impossível transmitir num texto todos os pormenores técnicos necessários para a obtenção de bons cortes. Nesta pesquisa fizemos cortes de 500 micrometros em 500 micrometros 5 cortes por blocos.



Fig.7 - Micrótomo

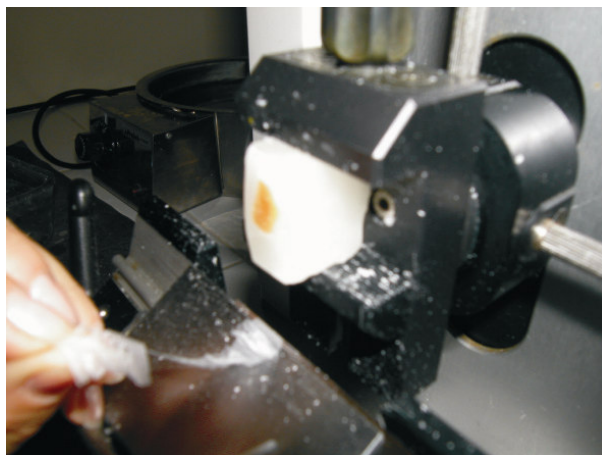


Fig. 8 Microtomia

As fitas de cortes obtidas durante a microtomia são então, com o auxílio de uma pinça, transferidas para um banho-maria especial com o fundo pintado de preto ( para visualização) e regulado a uma temperatura de 40°C. A fita é colocada de modo a encostar primeiro na água a sua extremidade livre e depois gradualmente o resto. Este procedimento gradual evita o inconveniente de formar bolhas de ar embaixo da fita. Outro procedimento muito usado é cortar as fitas e depois colocar os seus segmentos no banho-maria. Fig. 9



Fig. 9 - Transferência das fitas das lâminas.

Uma vez na superfície da água os cortes são distendidos imediatamente por meio de uma pinça de pontas curvas com a finalidade de retirar dobras que se formam freqüentemente durante o corte.

Após a sua distensão os cortes são separados individualmente ou em grupos de 2 ou mais, conforme se deseja, graças ao uso de pinças e estiletes e, então, colhidos na superfície de uma lâmina previamente preparada mergulhada diagonalmente dentro do banho-maria. Fig. 10

Os cortes assim obtidos são então transferidos para a estufa a 60°C, onde são colocados em suportes de madeira inclinada. Nesta fase os cortes se distendem mais um pouco, onde são secos durante 1 a 2 horas.



Fig. 10 - Cortes dos blocos sendo colocados nas lâminas.

#### ***1) Preparo prévio das lâminas que vão receber os cortes***

É importante usar lâminas limpas para colher os cortes. Recomenda-se a imersão das lâminas em detergentes, sua lavagem em água e estocagem em álcool 80%. Antes de usar, as lâminas são secas com pano de fralda e guardadas.

Às vezes os cortes têm uma tendência a se desprenderem da lâmina durante a coloração. Para evitar isto é habitual revestir a superfície que vai entrar em contato com o corte, com uma delgada camada de proteína. As proteínas utilizadas são a albumina do ovo e

a gelatina.

### ***Colorações***

A coloração dos tecidos é uma etapa indispensável para poder estudar com eficiência os cortes no microscópio óptico, e consiste geralmente em corar de diferentes cores, estruturas presentes nos cortes previamente incolores.

#### **a) Coloração de cortes de material incluindo em parafina**

A grande maioria dos corantes é diluída em água ou álcool fraco, razão pela qual é necessário retirar a parafina e hidratar os cortes (**banhos nos cortes em álcool a 100%, 90% e 70%**). Este procedimento é feito em uma série de frascos contendo sucessivamente xilol, álcool, e água, numa sequência, portanto inversa à seguida para a inclusão em parafina. Fig. 11 Recomenda-se agitar suavemente as lâminas com os cortes durante este procedimento.

Uma vez os cortes na água, é importante não esquecer de retirar os restos de fixador que ficaram no corte antes de iniciar a coloração.

Uma vez hidratados, os cortes são corados de acordo com o procedimento que se queira, após o qual se terá que percorrer o caminho inverso da desparafinação e hidratação – no fim do qual se procederá ao que se chama de *montagem da lâmina*. Este processo consiste em colocar uma gota de resina sobre o corte e cobri-lo com uma lamínula. Após algum tempo a resina seca e obtém-se assim um preparado permanente que, se for bem feito, poderá durar dezenas de anos.

O procedimento de montar as lâminas consiste essencialmente de:

Retirar a lâmina do último banho de xilol e com um pano limpo retirar o xilol do dorso da lâmina e das duas regiões laterais, onde não tem corte.

Pingar uma gota de resina sobre o corte. Cobrir o corte com uma lamínula rigorosamente limpa, de modo que a lamínula desça gradualmente e em diagonal sobre o corte. Não coloque a lamínula paralelamente ao corte, pois isto formará bolhas de ar.

Pressionar suavemente a lamínula com uma pinça, retirando assim um eventual excesso de resina e bolhas de ar.

Guardar a lâmina na estufa, ou fora até o dia seguinte, quando já se iniciou o endurecimento da resina. Retirar o excesso de resina raspando com uma gilete e rotular a lâmina.



Fig. 11- Processo de corar as lâminas.

#### COLORAÇÃO:

- Pegar essas Lâminas da estufa colocar em dois xilóis para sair a parafina e ficar só o corte da peça na lâmina, então seguimos a seguinte sequência:

- Xilol - 10' de imersão,
- Xilol - 10'
- Alcool Abdoluto - 1'
- Alcool 80% - 1'
- Alcool 70% - 1'
- Água corrente - 5'
- Hematoxilina - 5'
- Água corrente - 5'

- Eosina - 1'

Depois passar em:

- Alcool 70%, 90%, Absoluto, Absoluto, Absoluto, Absoluto, Xilol e Xilol (dar uns 10 mergulhos em cada cuba com esses produtos)

## MONTAGEM

- Montar com Entelan ou Bálssamo do Canadá.
- Colocar uma gota de entelan numa lamínula e colocar a lâmina com o corte já colorido em cima. Tirar todo ar ou bolha que estiver entre a lâmina e lamínula e deixar secar.

As imagens das lâminas estão no apêndice C.